

**DETERMINACIÓN DE MICRODELECCIONES DE REGIONES AZF DEL
CROMOSOMA Y E INFERTILIDAD, 2009**

**DETERMINACIÓN DE MICRODELECCIONES DE REGIONES AZF DEL
CROMOSOMA Y E INFERTILIDAD, 2009**

AUTORA

GISELA GONZÁLEZ RUIZ

Estudiante Ciencias Básicas Biomédicas

DIRECTOR:

CARLOS SILVERA REDONDO

Dr. En genética

UNIVERSIDAD DEL NORTE

DIVISIÓN SALUD-DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BARRANQUILLA, 2010

NOTA DE ACEPTACIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

UNIVERSIDAD DEL NORTE
DIVISIÓN SALUD-DEPARTAMENTO DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BARRANQUILLA, COLOMBIA 2009

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con especial amor, a mis hijos Orlando, Adriana y Gisela, que han representado a través de los años mi mayor y mejor motivación de vida; a mi esposo Orlando y a mi madre Blanca, con quienes compartía cada situación relacionada con la misma; cada momento de esta travesía, donde mis emociones evocaban, felicidad, preocupación, buen humor y hasta tonterías y disgustos.

De la misma forma al Profesor Carlos Silvera Redondo, por su apoyo durante este proceso.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos:

A Dios por la fortaleza dada para solucionar los impases propios de unos estudios costosos y sin fuentes de financiación.

A la Universidad del Norte y sus docentes por la formación impartida

A Ramiro Abad Gómez, Isis y José Luis, sencillos y estupendos profesionales que colaboraron desinteresadamente con este proyecto

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	xi
GLOSARIO	xii
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	17
1. JUSTIFICACIÓN	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 GENERAL	
2.2 ESPECÍFICOS	
3. MARCO TEÓRICO	22
4. ESTADO DEL ARTE	31
5. METODOLOGÍA	42
6. RESULTADOS	48
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70

9. BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	83

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1: Distribución de pacientes de acuerdo a resultados
de espermogramas 50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº 1:	Esquema del aparato sexual Masculino.....	24
FIGURA Nº 2:	Estructura del cromosoma Y.....	29
FIGURA Nº 3:	Regiones AZF del cromosoma Y.....	30
FIGURA Nº 4:	Ubicación de Regiones de Azoospermia en el Cromosoma Y.....	48
FIGURA Nº 5:	Genes estudiados por zonas AZF	49
FIGURA Nº 6:	Productos de amplificación PCR Multiplex A, B, C, D y E del cromosoma Y.....	51
FIGURA Nº 7:	Producto de PCR Multiplex en los casos de infertili dad 1 al 3.....	52
FIGURA Nº 8:	Producto de PCR Multiplex en los casos de infertili dad 4 AL 10.....	53
FIGURA Nº 9:	Producto de PCR Multiplex en los casos de infertili dad casos 11 al 22.....	54
FIGURA Nº 10:	Producto de PCR Multiplex en los casos de infertili dad casos del 23 al 28.....	55
FIGURA Nº 11:	Producto de PCR Multiplex en los casos de infertili dad casos 29, 30, 32 y 33.....	56
FIGURA Nº 12:	Proporción de microdeleciones encontradas, cromo soma Y, 2008	58
FIGURA Nº 13:	Producto de PCR Multiplex caso de infertilidad 31...	59

FIGURA N° 14: Regiones de azoospermia AZF del cromosoma Y
AZF delecionado y su comparación con PCR Multi
Plex máster mix, 2008..... 61

FIGURA N° 15: Producto de PCR Multiplex comparativo, entre
Cuatro casos con presencia de bandas génicas y
Un caso con Microdelección del cromosoma Y
Región (AZFc) 62

LISTA DE ANEXOS

Consentimiento informado..... 84

Ficha Resultados de PCR87

GLOSARIO

ADN:	Molécula polimérica formada por la combinación de cuatro tipos distintos de nucleótidos, de timina, adenina, citocina y guanina; generalmente forma una doble hélice en donde las adeninas se aparean con las timidinas y las citocinas con las guaninas, mediante puentes de hidrógeno, transmite la información genética en la mayoría de los organismos
AZFa:	Región de azoospermia del cromosoma Y, ubicada en la región proximal del Yq
AZFb:	Región de azoospermia del cromosoma Y, ubicada en la región media del Yq, entre el AZFa y Región proximal AZFc/AZFd
Proximal AZFc/AZFd:	Nueva región de azoospermia del cromosoma Y, comprendido entre AZFb y AZFc
AZFc:	Región de azoospermia del cromosoma Y, ubicada en la región distal del Yq
AZOOSPERMIA:	Ausencia de espermatozoides en el líquido seminal

CROMOSOMA:	Molécula de ADN que contiene parte o toda la información genética de un organismo, contiene los genes característicos de la especie a la que pertenece
CROMOSOMA Y:	Cromosoma sexual presente únicamente en varones, en una sola copia
DELECIÓN:	Pérdida de material genético o de un segmento de ADN de un cromosoma
INFERTILIDAD:	Incapacidad para quedar embarazada después de 12 meses de relaciones sexuales, sin usar mecanismos anticonceptivos
MICRODELECIÓN:	Pérdida de material genético, que comprende en la mayoría de los casos 1 a 3 millones de pares de bases
OLIGOZOOSPERMIA:	Baja cantidad de espermatozoides en el líquido seminal, menos de 20 millones /ml
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa; amplificación exponencial in vitro de moléculas de DNA a través de múltiples ciclos de

desnaturalización, hibridación de primers, y síntesis de ADN

STS:

Sitio de secuencia específica corta de ADN (200 a 500 pb), único en el genoma de la especie en estudio y cuya secuencia de base es conocida y recuperable físicamente a partir de DNA, mediante PCR.

RESUMEN:

La infertilidad afecta una de cada siete parejas y, el varón es responsable del 50% de la afección. Dentro de las múltiples causas que generan la infertilidad, se encuentran, las alteraciones genéticas y de ellas podemos citar las *microdeleciones del cromosoma Y*, como factor relacionado con la azoospermia no obstructiva y la olizoospermia severa. Aquí estudiamos una población de 33 hombres que consultaron por infertilidad, confirmada mediante estudios de espermogramas. En estos pacientes se analizaron 17 STSs, de las diferentes regiones de azoospermia, además del gen SRY el DS271 y Kaly. Para el análisis se efectuó extracción de ADN, de sangre periférica mediante el protocolo de Bio-.mol, PCR multiplex máster mix de promega y corrido electroforético en gel de agarosa al 4%. Luego se visualizaron las imágenes a través de foto documentador; los hallazgos del estudio arrojaron un 3,03% de microdeleciones del cromosoma Y en los STSs: SY242, (DAZ) SY208 (DAZ), SY254 (DAZ), SY255 (DAZ) y SY157 (DYS240), comprometiendo toda la región AZFc para los STSs estudiados. La prevalencia encontrada en este estudio, concuerda con la presentada por investigaciones de otros países donde han encontrado una proporción de microdeleciones que oscila entre 0.1 al 18% aproximadamente.

PALABRAS CLAVES: Microdelección, cromosoma Y, Azoospermia, oligozoospermia y gen DAZ

ABSTRACT:

Infertility affects one in seven couples and the male is responsible for 50% of the condition. The multiple causes of infertility include genetic alterations and of them we can cite the Y chromosome microdeletions as a factor associated with nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. This research includes a population of 33 men who consulted for infertility, confirmed by semen analysis. In these patients, 17 STS were studied to analyze the various regions of azoospermia, in addition, the SRY gene and Kaly DS271. Data analysis was carried out DNA extraction from peripheral blood using the protocol of Bio-.mol, multiplex PCR master mix from Promega and run agarose gel electrophoresis in 4%. After, images were visualized through photo document; the study's findings showed a 3.3% Y-chromosome microdeletions in STSs: SY242 (DAZ) SY208 (DAZ), SY254 (DAZ), sY255 (DAZ) and SY157 (DYS240), compromising the entire AZFc region for STSs studied. Prevalence found in this is, agrees with that presented by research in other countries where they have found that a proportion of microdeletions varies from 0.1% to 18% approximately.

KEY WORDS: Microdeletion, Y chromosome, azoospermia, oligozoospermia and DAZ gene

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema, que de acuerdo a estadísticas mundiales, afecta a una de cada siete parejas y su origen puede deberse a alteraciones presentes en el hombre; de acuerdo a los últimos informes de investigaciones en el tema, representa más o menos el 50% en la proporción de infertilidad por sexo;^{3,4,5} este importante dato nos lleva a incrementar la búsqueda de causas reales de infertilidad que comprometan al sexo masculino.

Ahora bien, la infertilidad masculina puede estar asociada a múltiples factores internos y externos, entre ellos encontramos los de origen genético, y específicamente los relacionados con microdeleción del cromosoma Y. Los factores genéticos se han constituido en una importante causa de infertilidad a nivel mundial, su aparición puede ser de novo, o bien, heredada de padres a hijos, o incluso la descendencia lograda mediante ICSI (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides) hereda la microdeleción. Su proporción, de acuerdo a estudios en diferentes países, oscila entre el 0,1 a 18% y está relacionada con fenotipos de azoospermia no obstructiva y oligozoospermia (menos de 20 millones de espermatozoides por ml de líquido seminal)²⁰. Los estudios han demostrado que la afección puede presentarse en cualquier etapa de la vida reproductiva del hombre, aún en aquellos, con historia previa de fertilidad normal.

Con este estudio se pretende determinar el comportamiento, para dicha alteración en hombres consultantes por infertilidad, “Incapacidad de

completar un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales, sin mecanismos anticonceptivos” de la costa Caribe, ciudades de Barranquilla y Sincelejo, donde se efectuó el 100% de recolección de muestras. Teóricamente el estudio se fundamenta en la necesidad de confrontar los hallazgos sobre casos a nivel mundial, con los posibles casos, encontrados en hombres de nuestra región (Caribe Colombiano), donde las alteraciones relacionadas con infertilidad masculina por microdelección del cromosoma Y, no han sido descritos hasta ahora, lo que hace que exista poca documentación sobre el tema, desconociéndose por ello, el comportamiento de la infertilidad por pérdidas de material genético de las regiones de azoospermia (AZF a, b, c y Proximal AZFc/AZFd), que nos permita conocer datos exactos sobre prevalencia y tipo de microdeleciones en el cromosoma Y.

Esta investigación nos permite avanzar hacia el conocimiento más claro, sobre el comportamiento de la microdelección del cromosoma Y, en la región Caribe, orientando nuevos estudios, que lleven no solo a identificar, la prevalencia y tipo de microdelección existente, sino, a profundizar aspectos relacionados con fenotipificación del cromosoma Y, comportamiento de las microdeleciones de acuerdo a haplotipos de genes de la familia DAZ, clasificación de la microdelección y factores asociados a su presentación.

1. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la infertilidad por causas genéticas es un campo que debe profundizarse, considerando la misma como: “La incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales, sin medidas anticonceptivas”¹

El presente estudio permitió identificar la presencia de microdeleciones en la población objeto de estudio, pertenecientes a la Costa Caribe de Colombia y de esta manera ampliar el horizonte del conocimiento para este tipo de alteraciones, los datos logrados son un aporte no solo al conocimiento mismo de la infertilidad, sino, que traslada la mirada de profesionales en el área de atención hacia formas diagnósticas existentes que conlleven a su tipificación, aún más con datos estadísticos determinados por la OMS, de 60 y 80 millones de parejas con infertilidad². Con una proporción de más o menos 50% de casos asociados a la infertilidad masculina³, por lo tanto la presente investigación nos amplió nuevos horizontes en su conocimientos; teniendo en cuenta que la afección se presenta en el 10% – 15% de las parejas y que el factor masculino es el responsable de aproximadamente 50% de los casos^{4,5}.

Actualmente múltiples estudios han avanzado en las otras causas de infertilidad masculina.^{5,67} Los factores genéticos, aportan el 5% a la misma (Teppa, 2004), manifestándose por alteraciones que fenotípicamente se relacionan con mala calidad seminal⁸. Alteraciones que de acuerdo a la literatura mundial, ocupan un lugar importante en las causas de infertilidad y han demostrado manifestarse, en muchos

casos, de zoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa, comprobadas a través de pruebas de semen y biopsias testiculares.

Las microdeleciones de los factores de azoospermia (AZFa, AZFb, Proximal AZFb/AZFc y AZFc) se han identificado en múltiples estudios de investigación, a nivel mundial, a través de técnicas citogenética y biomoleculares. Esta invaluable ayuda diagnóstica fue utilizada en nuestro caso para establecer la prevalencia de la alteración en la población de estudio, en hombres con diagnóstico previo de infertilidad y pertenecientes a la región Caribe Colombiana, ciudades de Barranquilla y Sincelejo.

Considerando la importancia que juegan los factores ambientales, en la condición genética de la población y, teniendo en cuenta las microdeleciones del cromosoma Y, se pudo comprobar la existencia de un caso en la población estudiada y cuyos valores se mueven en los datos estadísticamente reportados por otros países y regiones del mundo, además de que permitió identificar el tipo de microdelección presentada. Aún en un país donde poco se ha profundizado en el tema, encontrando que a nivel nacional solo encontramos estudios publicados en Bogotá y Cali y pocos referentes en sur América (Venezuela, Perú).

El factor de alta variabilidad y extensión de las regiones AZF, dificulta disponer de pruebas, que sean capaces de identificar el comportamiento en cada una de sus regiones; por lo tanto, continuar estudiando su estructura y comportamiento, nos ayudará a resolver más claramente el problema planteado en la alteración de la fertilidad masculina, para ello, acercarnos al conocimiento de las que existen, es el primer paso que debemos abordar.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la microdelección del cromosoma Yq, regiones AZF a, b y c y proximal AZFc/AZFd en hombres infértiles, con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia, diagnosticados previamente mediante espermograma, y residentes en las ciudades de Barranquilla y Sincelejo 2008-2009

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los casos de infertilidad, con diagnóstico de azoospermia y oligozoospermia (menos de 12 millones de espermatozoides por ml). A través de espermograma y concepto de médico tratante.
2. Identificar la presencia de microdelección de regiones AZF a b y c y proximal AZFc/AZFd del cromosoma Y, a través de PCR multiplex en la población de estudio.
3. Determinar tipo y prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en la población estudiada

3. MARCO TEÓRICO

La reproducción es el mecanismo natural mediante el cual se preserva la vida de las especies, entendida como la función vital que permite originar individuos semejantes. La reproducción sexual está conformada por dos etapas, una primera llamada **gametogénesis**, en la cual se produce el gameto o unidad reproductora mediante el proceso de meiosis y la segunda etapa de **fecundación**, durante la cual el gameto masculino y el femenino se unen para formar el huevo o cigoto. Las células haploides especializadas para la fusión sexual masculina, reciben el nombre de gametos, típicamente se forman dos tipos de gametos: uno es grande e inmóvil y se denomina oocito (o huevo) y el otro es pequeño y móvil y se denomina espermatozoide. Durante la fase diploide que sigue a la fusión de gametos, las células proliferan y se diversifican formando un organismo pluricelular complejo.⁹

La gametogénesis es el proceso por el cual las células diploides experimentan meiosis para producir gametos haploides altamente diferenciados y especializados. Aunque la formación de gametos difiere en cada sexo, el espermatozoide y el óvulo son homólogos e involucran transformaciones morfo-fisiológicas. El espermatozoide debe reconocer y acoplarse a componentes específicos de la zona pelúcida del ovulo para que la fertilización ocurra ⁹

En la espermatogénesis las células germinativas primordiales se sitúan en los testículos en forma de cordones macizos. En la pubertad crecen y se convierten en espermatogonias, en ese momento los cordones

macizos se convierten en tubos huecos, los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli, las cuales provienen del epitelio de la membrana del túbulo seminífero sirven de sostén y nutrición a las espermatogonias. Hay dos tipos de espermatogonias:

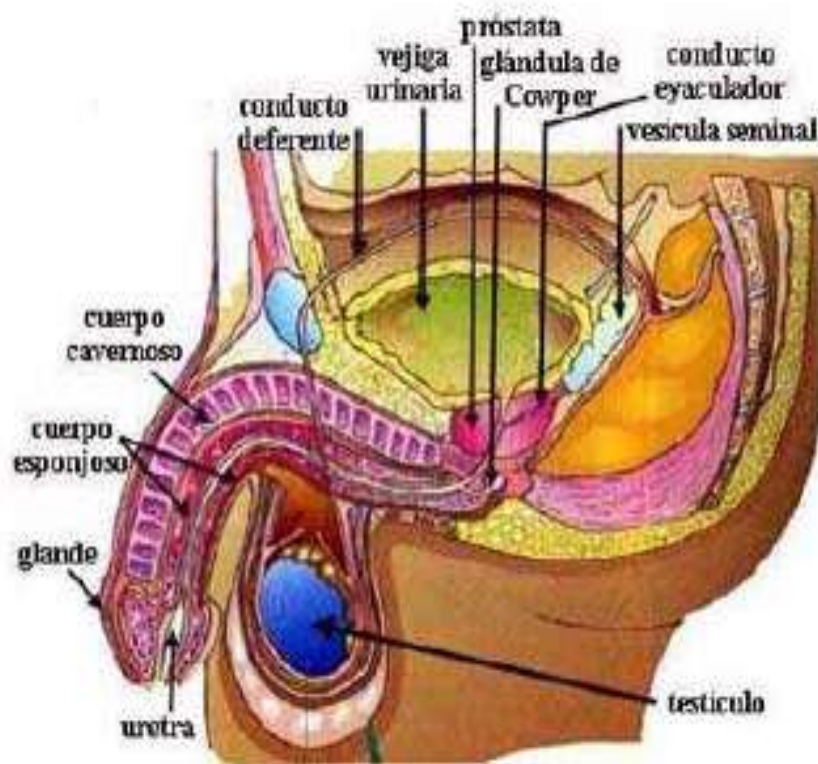
Espermatogonias tipo A: Se dividen por mitosis para formar una reserva continua de células madre.

Espermatogonias tipo B: Derivan de las A, se dividen también por mitosis y dan origen al diferenciarse a los espermatocitos primarios.

Los espermatocitos primarios entran en una profase prolongada (22 días), seguida por una finalización rápida de la meiosis y la formación de espermatocitos secundarios. Durante la segunda división meiótica estas células comienzan inmediatamente a formar espermátides haploides. La citocinesis en estas células no es completa hasta la formación de las espermátides pues quedan unidas por puentes citoplasmáticos. La hipófisis controla las células de Leydig por medio de la hormona luteinizante (LH) haciendo que produzcan testosterona que favorece la espermatogénesis..¹⁰ La maduración de las espermátides origina el espermatozoide que consta de cabeza, cuello, cuerpo y cola, en la cabeza posee una estructura, denominada acrosoma que le permite penetrar al óvulo; la cola le proporciona la movilidad a través de los fluidos a una velocidad de 30Km/hr ¹¹

El proceso de espermatogénesis se lleva a cabo en los órganos sexuales masculinos que anatómicamente están constituidos por los testículos, las vías espermáticas, el pene, la próstata, la uretra masculina, (Figura N°1)

FIGURA Nº 1: ESQUEMA DEL APARATO SEXUAL MASCULINO, 2009



Las alteraciones en el funcionamiento del sistema reproductor masculino o femenino, genera infertilidad la que se define como “la incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas”. El origen de la infertilidad puede presentarse en la mujer o en el hombre. En este estudio, abordaremos solo una causa masculina de la infertilidad.

Las piedras angulares de la investigación andrológica continúan siendo la historia clínica, el examen físico y el espermograma de infertilidad. Una vez ante el paciente, se comienza por la historia clínica, la cual permite orientar el diagnóstico; por tanto, se aconseja realizar una historia integral que comprenda básicamente el interrogatorio acerca del motivo de consulta, antecedentes patológicos personales y familiares, antecedentes de fertilidad (paciente y pareja), función sexual y hábitos psicobiológicos

(para detectar la posible exposición a drogas, factores ambientales y/o laborales), el examen físico que, aunque se evalúa todo el cuerpo, está dirigido a la zona genital y a los caracteres sexuales secundarios (fenotipo, vello axilar y púbico, barba, voz), sin olvidar descartar ginecomastia y anosmia. La exploración andrológica se enfoca sobre el pene (buscando fimosis, hipospadias, cicatrices, placas de induración), testículos y epidídimo (posición, tamaño, consistencia y sensibilidad). El volumen testicular se aprecia mejor con el orquidómetro de Prader o el de Seager, considerándose un volumen de 20 a 24 cc como normal, mientras un volumen menor a 10 cc traduce una importante disminución del tejido espermatogénico y se correlaciona con valores elevados de FSH y bajos de inhibina. El tacto rectal se realiza sólo en aquellos casos que se considera conveniente evaluar características de la próstata¹²

La valoración del espermograma se inicia con las características macroscópicas, que comprenden fundamentalmente el volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad y olor. Posteriormente, se inicia el estudio microscópico, mediante el cual se valora de forma cuantitativa y cualitativa a los espermatozoides, la aglutinación (cuando están vivos, unidos entre sí) o la agregación (cuando están probablemente muertos, unidos a otras células). Para evaluar todo ello se emplea un microscopio con aumento de 400X. Clásicamente, la valoración cuantitativa del semen se reporta de acuerdo con los valores preestablecidos por la OMS. La concentración espermática se calcula rápidamente mediante el empleo de cámaras especializadas, como: Makler, Horwell, Petroff-Hausser, Microcell, el hemocitómetro de Neubauer o el portaobjetos de Chartpak. Desde hace poco tiempo, se utilizan sistemas tecnológicos comerciales para análisis de imágenes digitales de cantidad, motilidad y características del movimiento de los gametos masculinos, conocidos como análisis espermático asistido por computadora (CASA), los cuales

han venido superando las limitaciones originales y aunque permiten un examen más objetivo, no reemplazan al espermograma tradicional.

La evaluación endocrina se realiza en todos los hombres con parámetros seminales anormales o con alteraciones clínicas de baja androgenización, aunque se recomienda realizarla en todos los varones infértiles. Básicamente se miden la foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH) y Testosterona (T). Cuando ocurre un hipogonadismo hipogonadotrópico, además hay que valorar la prolactina y la tirotropina (TSH) y realizar resonancia magnética nuclear de la silla turca, para investigar si existe la presencia de patología hipotalámico-hipofisiaria. Este último examen está indicado en el caso que los testículos estén muy disminuidos de tamaño, la prolactina sea superior a 100 ng/mL o existan manifestaciones neurológicas por lesión de ocupación de espacio. Contrariamente, si se presenta un hipogonadismo hipergonadotrópico es conveniente realizar un cariotipo. Si este último resulta alterado, es posible considerar realizar una biopsia testicular, sólo si el testículo es de buen tamaño (mayor de 5 ó 10 cc), pues de lo contrario la posibilidad de encontrar espermatozoides es prácticamente nula.¹²

Es importante investigar la posible causa de la azoospermia, básicamente, diferenciar entre si es obstructiva o secretora. En general, la orientación hacia la azoospermia de causa obstructiva vendrá dada por los antecedentes personales a episodios de epididimitis, prostatitis o cirugía inguinoescrotal. En caso de asociarse con ausencia congénita de los conductos deferentes, posiblemente involucra una causa genética adicional. En contraste, la azoospermia secretora o no obstructiva es consecuencia de una estimulación hormonal inadecuada y se sospecha por los antecedentes de criptorquidea, orquitis, traumatismos, radio o

quimioterapia. Las situaciones de azoospermia secretora son por causas pretesticulares o consecuencia de arrestos de la espermatogénesis, síndrome de sólo células Sertoli, hialinización testicular o hipoespermatogénesis severa, o por alteraciones relacionadas con deleciones del cromosoma Y¹²

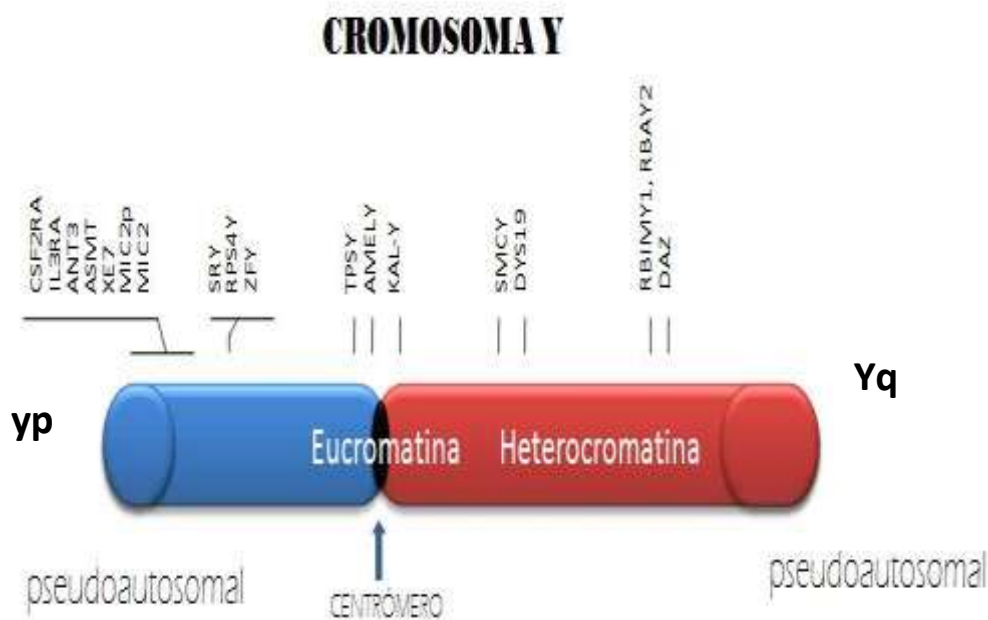
Clínicamente, la azoospermia de causa obstructiva se caracteriza por testículos de buen tamaño pero aumentados en consistencia. En el semen se detectan valores de ácido cítrico aumentado y fructosa bajos, con reacción de pH ácida. En cambio, la azoospermia secretora cursa con testículos de tamaño y consistencia reducidos, o en ciertos casos, ausencia de los mismos. Los valores de ácido cítrico, fructosa y pH son normales, mientras la FSH está elevada. Básicamente, las alteraciones de las células germinales se descartan con una biopsia testicular normal, preferiblemente mediante varias punciones simultáneas, aunque se pueden realizar otras exploraciones para investigar la obstrucción de las vías seminales. En este sentido, la obstrucción se puede hacer evidente con una deferentovesiculografía, la cual se realiza pasando a través de los conductos deferentes 3 a 5 ml de Hypaque al 25% o 45%. Como parte del diagnóstico diferencial hay que chequear la orina poseyacuación para descartar una eyacuación retrógrada. Curiosamente, esta última se sospecha cuando ocurre el orgasmo sin la eyacuación. En algunos casos de pacientes afectados por el síndrome de “del Castillo”, un tipo de azoospermia secretora caracterizada por aplasia de las células germinales y donde las únicas células existentes dentro de los túbulos seminíferos son las de Sertoli, no hay que perder las esperanzas porque, probablemente, no todos estos casos son puros y, en consecuencia, se han descrito casos de hallazgos de espermatozoides mediante TESE, seguido por embarazos exitosos ¹²

Según Sharif y col. (2000) basándose en clasificaciones anteriores, propone una clasificación de la azoospermia más desglosada:

- Azoospermia pretesticular: incluye todos los casos de hipogonadismo hipogonadotrófico: congénitos (síndrome de Kallmann), adquiridos (traumas, tumores) o idiopáticos. En los que se recomienda realizar un estudio del eje hipotálamohipofisario, tanto endocrino como radiológico. En este tipo de azoospermia el tratamiento hormonal sustitutivo puede dar buenos resultados.
- Azoospermia testicular: incluye todos los desordenes testiculares congénitos (síndrome de Klinefelter, deleciones del cromosoma Y), adquiridos (radioterapia, quimioterapia, torsión testicular, orquitis) o de desarrollo (criptorquidia). En estos casos, se debe realizar un adecuado estudio genético del paciente: cariotipo, estudio de microdeleciones del cromosoma Y y biopsia testicular con criopreservación de espermatozoides para ICSI.
- Azoospermia posttesticular: incluye los casos con obstrucción o disfunción en los conductos seminales (eyaculación retrograda). La obstrucción puede ser congénita (ausencia de conductos deferentes) o adquirida (cirugía, infección). (tomado de Rafaela González)⁵³ La azoospermia y la oligozoospermia se han relacionado a alteraciones genéticas de microdeleciones del cromosoma Y.

Entrando al conocimiento del cromosoma Y, encontramos que este es acrocéntrico, considerado el más pequeño de todos, contiene unos 60 millones de pares de bases y sus genes determinan la espermatogénesis;¹⁵ posee la zona eucromatínica que comprende los brazos cortos (Yp); La mayor parte de los brazos largos (Yq), es heterocromatina y no recombina durante la meiosis, (Figura N° 2)

FIGURA N° 2: ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA Y, 2009



En el brazo largo (Yq) se encuentran las regiones de azoospermia AZF, subdivida en cuatro regiones AZFa, AZFb, Proximal AZFc/AZFd y AZFc¹⁵ la delección en estas zonas puede originar alteraciones como azoospermia no obstructiva o la oligozoospermia severa¹⁶. (Figura N° 3)

Se cree que el cromosoma Y y el X eran homólogos y que durante los últimos 200 millones de años, el Cromosoma Y sufrió degradación de su contenido génico, quizá como consecuencia de mantener los genes específicos de diferenciación masculina RBM:¹⁴

**FIGURA 3: REGIONES DE AZOOSPERMIA DEL CROMOSOMA Y,
2009**



Cada una de las regiones AZF está conformada por un número de genes y su delección puede llevar a anomalías en la espermatogénesis, con la consecuente alteración en presencia y/o cantidad de espermatozoides, generando alteraciones en la reproducción masculina.

Los datos anteriores son la fundamentación teórica para buscar ampliar los conocimientos de los casos posibles de microdeleciones de las regiones AZF del cromosoma Y, lo cual trae consigo una alteración de la espermatogénesis, originada por ausencia de genes que comanden esta función.

4. ESTADO DEL ARTE DE MICRODELECIÓN DEL CROMOSOMA Y

Las causas de infertilidad masculina pueden estar asociadas con alteraciones de genes específicos como lo han demostrado diversos estudios. La primera evidencia de un gen presente en el cromosoma Y con significado clínico, se originó en la observación hecha en individuos con variantes en el cariotipo que incluyen al cromosoma Y (46,XY, 47,XXY, 47,XYY), poseen fenotipo de varón, mientras, que los individuos con variantes del cariotipo sin cromosoma Y (46,XX; 45,X; 47,XXX), poseen fenotipo femenino¹³ observaciones que ofrecieron la oportunidad de definir que el cromosoma Y es el encargado de la diferenciación sexual masculina. Considerado el más pequeño de todos, contiene los genes que determinan la espermatogénesis. Varios genes candidatos del cromosoma Y han sido identificados en la función específica de la espermatogénesis de los mamíferos, en la actualidad es el único conservado en la especie. Estructuralmente el cromosoma Y es acrocéntrico tiene unos 60 millones de pares de bases, posee una zona eucromatínica que comprende los brazos cortos. Por otro lado, la mayor parte de los brazos largos es heterocromática y no recombina durante la meiosis, donde se encuentra la zona denominada *región de azoospermia* (AZF) subdividida en cuatro subregiones: (AZF a, b, c y d o proximal AZFb/AZFc)¹⁵ y su delección puede originar alteraciones como la azoospermia y la oligozoospermia severa.¹⁶

El origen de las delecciones es actualmente un tema de discusión, puede ésta surgir en las etapas meióticas, en fases posteriores de la formación espermática o después de la fertilización¹⁷. En consecuencia, se han

realizado varios estudios que buscan el análisis de transmisión germinal de deleciones de generación en generación. La deleción del AZFb fue confirmada usando PCR y pruebas de southern blotting¹⁸, confirmando la deleción de la región AZFb del cromosoma Y en tres generaciones. Por otro lado los estudios de Kats M.G et al 2002. Kamischke A, 1999, demostraron la transmisión de la deleción de padres a hijos después de efectuar ICSI¹⁹. La frecuencia de deleciones del cromosoma Y, reportadas a nivel mundial es la siguiente: Alemania 3,2% (12/370), 1,3% (19/1470), Suecia 2% (4/192), Países bajos y Bélgica 2,3% (37/1627), Irlanda 3,6% (2/56) y Eslovenia 4,4% (9/226) entre otros (31)²⁰

Los primeros en identificar la relación existente entre deleción del cromosoma Y e infertilidad masculina, fueron Tiepolo y Zuffardy en 1976, quienes investigaron a 1160 hombres infértiles, a los que se le realizó cariotipo, logrando detectar deleción en el 0.5% del total de la población. La identificación del factor de azoospermia (AZF), ubicado en Yq, se clasificó como AZFa, ZFb, AZFc²¹. La deleción de genes en cualquiera de estas regiones puede llevar a anormalidades en la espermatogénesis²² con la consecuente alteraciones en presencia y/o cantidad de espermatozoides, provocando azoospermia u oligozoospermia, o sea ausencia o reducción del número de espermatozoides en el líquido seminal²³. Sin embargo, se ha identificado una nueva zona que al parecer se encuentra en límites de AZFb – AZFc, denominada AZFd o proximal AZFb/AZFc; la deleción de una de varias regiones AZF, puede ser hasta de 792 Kb.

En la actualidad se ha podido avanzar en el mapeo del cromosoma Y, logrando identificar el tamaño y localización de las regiones AZF²⁴, identificando los genes que conforman las regiones de azoospermia²⁵. Un

nuevo avance en la determinación de la región específica del cromosoma, logró el mapeo completo del 99% de éste y la secuencia de la región específica masculina del cromosoma (MSY) quienes describen tres regiones: X-tranposed, X-degenerate y ampliconic.

En la región *X-Tranposed* un total de dos genes:

- TGIF2LY (gen factor de transcripción inducido)
- PCDH11Y (Protocadherin 11 Y), ambos de expresión en tejido testicular con homólogos en el cromosoma X.

La *Region X-Degenerate* hay un total de 16 genes:

- SRY (Gen que determina el sexo masculino con expresión en el tejido testicular)
- RPS4Y1 (Rybosomal protein S4)
- ZFY (zinc finger Y)
- AMELY (amelogyn Y)
- TBL1Y (Traduccin β .like 1 protein Y con expresión en tejido fetal y próstata)
- PRKY (Protein Kinase Y)
- USP9Y (ubiquitin .specific proteasa 9Y)
- DBY (dead Box)
- UTY (ubiquitous TPR motif Y)
- TMSB4Y (Thymosin β -4Y)
- NLGN4Y (neuroligin 4 isoform Y con expresión en cerebro fetal, próstata y testículos)
- CYorf15A (chromosome Y open reading 15^a)
- CYorf15B (chromosome Y open reading 15b)
- SMCY (SMC homologue Y)
- EIF1AY (translation initiation)

- RPS4Y2 (ribosomal protein S4 Y isoform 2). Todos estos genes tienen homólogos en el cromosoma X.

La región *ampliconic* con 60 genes, entre los que se encuentran:

- TSPY (testis specific protein Y, el de mayor copias con un total de 35)
- VCY (variable charge Y)
- XKRY (XK related Y)
- CDY (chromodomain Y)
- HSFY (Hawthorn Schock transcription factor Y)
- RBMY (RNA binding motif Y)
- PRY ((PTB-BL related Y)
- BPY2 (Basic protein Y2)
- Genes de la familia DAZ (Deleted Azoospermia)²⁶; todos los genes de esta región se expresan en tejido testicular y solo el VCY y el RBMY poseen homólogos en el cromosoma X. El gen HSFY ubicado en AZFb genera tres tipos de transcripciones diferentes: la primera parece transcribirse en varios tejidos, sin embargo la segunda y la tercera son testículo específicos ²⁷.

Las deleciones de AZFa se asocian al síndrome de Solo Células de Sertoli (SCO)²⁸ los genes DBY y USP9Y al parecer regulan la actividad de las espermatogonias²⁹. El gen DBY posee homólogos en el cromosoma X que están expresados en todos los tejidos, sin embargo, en hombres parece expresarse solo en tejido testicular, aunque son genes homólogos, divergen en sus formas de expresión y su deleción parece ser la causa más severa de patologías testiculares; las deleciones completas del AZFa se presentan con una prevalencia del 9% aproximadamente³⁰. En el bloqueo de la maduración detenida en fase de paquiteno está implicada la región AZFb, por lo tanto las

espermatogonias y espermatoцитos primarios son normales. La región AZFd, ubicada en límites entre las regiones AZFb y C, al parecer se asocia con oligozoospermia o esperma normal en número pero con anormalidades morfológicas²⁰. Se han identificado tres familias de genes en AZFb (RBM, PRY y TTY); Al analizar 180 pacientes infértiles, afectados con síndrome de solo células de sertoli (SCO) y diferentes grados de hipoespermatoгénesis, comparado con 50 pacientes con causas conocidas de anomalías testiculares y 30 con azoospermia obstructiva, y control positivo de 100 hombres con fertilidad conocida, se encontró que: en hombres con testiculopatías relacionadas con síndrome de solo células de sertoli (SCO) y severa hipoespermatoгénesis, la prevalencia de deleciones fue del 34,5% y 24,7% respectivamente, estos resultados coinciden con estudios realizados por otros autores. Las deleciones en AZFc comprometieron al gen DAZ en 17 pacientes de 40 (42,5%), 13 de 21 pacientes que presentaron hipoespermatoгénesis y 4 de 19 que presentaban SCO. Las deleciones que involucraron al gen RBM fue del 5%, o sea, seis (6) de 40 pacientes y la deleción del Gen DFFRY se presento en el 12,5%²⁷. La mayoría de microdeleciones presentes en el AZFc afectan al gen DAZ, por lo tanto, es el principal candidato a causar la azoospermia en pacientes infértiles; un estudio del gen DAZ copia específico, fue relacionado con la oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva en pacientes con patologías testiculares, demostrando que DAZ/1 y DAZ/2, se asocian con la oligozoospermia, de igual forma el fenotipo de testiculopatías severas idiopáticas es por ausencia de expresión del gen DAZ a nivel de estos órganos²⁸, un estudio de Saut Noemie en el 2000, concluyó que además del gen DAZ, en las deleciones del AFZc participan los genes BPY2 y el CDY1. Otro estudio llevado a cabo en poblaciones de origen étnico chino, identificó seis casos de deleciones del cromosoma Y, específicamente en AZFc, gen DAZ; en esta región existen genes adicionales como (PRY, BPY2, DAZ2, CDY1, BPY2, DAZ3, DAZ4)⁹. En población China, también fueron

analizados 202 casos de infertilidad, confrontados con 101 caso de hombres fértiles, lo que demostró microdelección del gen DAZ, comprometiendo en mayor porcentaje a azoospermicos que oligozoospermicos 6,8% y 3.5% respectivamente²⁹

Microdeleciones del gen DAZ de pacientes con oligozoospermia o azoospermia no obstructiva, fue hallada en el estudio de 10 STS de este gen (sY132, sY154, sY147, sY152, sY149, sY254, sY255, sY277, sY202, sY158) en 65 pacientes oligo o azoopérmicos, cariotipo, volumen testicular y concentraciones de testosteronas (DHT, LH y FSH.) normales, obteniéndose como resultado cuatro pacientes con delección, de todos los STSs estudiados, o sea, el 6% de deleciones. El número de genes DAZ ha sido difícil de determinar en parte porque sus secuencias de nucleótidos son idénticas, cada uno contiene por lo menos siete copias en tandem⁵⁴. Los diferentes grados de hipoespermatogénesis observados en hombres con deleciones AZF d y c (DAZ), puede ser atribuible al grado de compensación parcial de la delección por la presencia de un gen funcional homólogo autosómico presente en el cromosoma 3³⁰.

El modelo más aproximado para la identificación de las diferentes deleciones en la regiones (AZF a, b y c), fue publicado en el estudio que encontró que tres de 11 hombres poseían STSs sY105, sY149, pero estaban ausentes los STS sY117, sY127 y sY143. Siete pacientes mostraron resultados que indicaban deleciones en las regiones AZFb y c, tenían sY105 (proximal a AZFb) pero con ausencia de sY117, sY127, sY143, el último hombre tenía los STS de los siete anteriores menos el sY117. La población de hombres, todos con deleciones del cromosoma Y, habían sido identificados en una población total de 602 con azoospermia idiopática no obstructiva, 392 hombres con oligozoospermia severa.³¹ Sin

embargo, son necesarios mayores estudios en esta área que permita la identificación plena de los sitios exactos de deleciones.

A pesar de no haber correlaciones totalmente claras, los estudios han confirmado, que el compromiso de alteraciones testiculares en cada paciente depende de factores diversos, (Factor AZF comprometido, longitud de la deleción, número de AZF). La literatura científica asocia las deleciones con alteraciones como azoospermia, oligozoospermia moderada y severa, síndrome de solo células de Sertoli (SCO), bloqueo espermático meiótico, hipoespermatogénesis severa; mientras que las deleciones de AZFa se relacionan específicamente con Síndrome de solo células de sertoli, azoospermia no obstructiva e hipoespermatogénesis severa; las deleciones del AZFb, con azoospermia no obstructiva, bloqueo espermatogénico meiótico e hipoespermatogénesis; las deleciones de AZFc con azoospermia no obstructiva, oligospermia severa, hipoespermatogénesis, Síndrome de solo células de sertoli (en menor proporción); bloqueo espermatogónico meiótico; las deleciones de AZF a+b, AZF b+c , AZF a+b+c se asocian con azoospermia no obstructiva y síndrome de solo células de sertoli (SCO)³². A través de TESA y FNA en todos los pacientes con microdeleción Yq encontraron la siguiente asociación genotipo-fenotipo: deleciones AZFa completo y AZFb (P5 proximal P1) se presenta con SCO y bloqueo espermatogónico respectivamente, en este caso los pacientes son totalmente azoospermicos y con el uso de TESA o FNA, el resultado es de pocos o cero espermatozoides; pero si la deleción se dá solo en algunos genes, se puede encontrar espermatozoides y se asocia a bloqueo espermatogónico, lo anterior se traduce en que: los genes de AZFb están implicados en la regulación meiótica, mientras que los de AZFa están implicados en el proceso de diferenciación celular premeiótica y fase mitótica de la espermatogénesis; mientras que hombres con

microdeleciones AZFb-c ó AZFa+b+c, presentan daño espermatogónico mas severo, yendo desde SCO hasta bloqueo espermatogónico completo³³. En las deleciones AZFc B2/B4 existe la posibilidad de contener espermatozoides en su líquido seminal, lo que mejora el pronóstico reproductivo de estos pacientes³⁴, aunque se recomienda la crioconservación de espermias, antes de que la deleción se traduzca en fenotipos más severos.

La azoospermia ha sido comprobada en estudios en hombres previamente diagnosticados con microdeleción AZF, a, b y b-c, sin embargo las deleciones AZFc, han mostrado que pueden dar como resultados espermatozoides³⁵, lo anterior sugiere la importancia de identificar la zona con microdeleción al momento de intentar la recuperación de espermatozoides para ICSI. De acuerdo a Simoni M. et al 2004, las microdeleciones son frecuentes en hombres infértiles, presentándose con mayor proporción entre azoospermicos que en oligozoospermicos severos, se requiere por tanto, una cuidadosa selección de los pacientes, lo que exige una revisión clínica andrológica inicial en busca de criterios que puedan constituirse en factores de confusión a la hora de identificar los resultados, tener claridad de los criterios fenotípicos generados por las microdeleciones del cromosoma Y y, de las patologías asociadas que pueden presentar signos similares. Un estudio denominado “Determinación de factores genéticos en infertilidad masculina idiopática”, identificó 30 azoospermicos y 16 oligozoospermicos; de 46 pacientes con infertilidad masculina idiopática, con criterio previo de inclusión y después de estudiar las otras causas de infertilidad masculina, usando 50 hombres con fecundidad demostrada, como controles positivos, mediante la técnica molecular de detección de deleciones por PCR múltiplex en 18 STSs, localizados en Yq (AZFa,b, c y d) cariotipo analizado con la técnica de bandeo G, el estudio mostró

microdeleciones en 3 varones, en la regiones AZF a, b y c respectivamente³⁶. De acuerdo al Instituto de Medicina Reproductiva de la Universidad de Mosters, Germany, la microdelección ocurre con diferentes frecuencias en cada uno de las regiones AZF.

Uno de los investigadores que más ha profundizado en estudios de microdeleciones es Carlo Foresta de la Universidad de Padova Italia, quien caracterizó clínica y molecular las deleciones del cromosoma Y, en hombres infértiles (1996 – 2005) en un total 3073 casos, identificó 99 con microdeleciones. Contribuyeron a estos casos 3,2% hombres no seleccionados, 8,3% con azoospermia no obstructiva y 5,5% con oligozoospermia severa (menos de 5 millones de espermatozoides por ml) , lo anterior permite tener en cuenta los mecanismos de selección clínica de los pacientes con alteraciones fenotípicas relacionadas con la infertilidad, permitiendo tener mayor claridad a la hora de escoger los criterios de inclusión de los pacientes candidatos a técnicas biomoleculares para identificación de deleciones de regiones AZF³⁴

Otras patologías testiculares asociadas a microdeleciones del cromosoma Y han sido estudiadas, sin encontrar una relación entre ellas, como es el caso del estudio de pacientes con cáncer de células germinales realizado en 160 pacientes³⁷ que buscó la relación entre la función de las glándulas pituitarias y los síndromes relacionados con alteraciones genéticas (Klinefelter's y deleciones del cromosoma Y) encontrando niveles de FSH mas altos en la primera alteración que en la segunda, mientras, que el estradiol y la testosterona no mostraron diferencia, sin embargo, las alteraciones como la criptorquidia, parecen estar relacionadas con deleciones AZF³⁸.

Los avances en la identificación de las microdeleciones del cromosoma Y, se logró gracias a las nuevas técnicas biomoleculares, pasando, de los estudios de cariotipo a los estudios citogenéticos con resultados más precisos, gracias a estudios de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dichos avances han sido significativo y de gran provecho para determinar este tipo de alteraciones. El estudio “Análisis molecular de microdeleciones en el intervalo seis (6) del cromosoma Y en varones infértiles” quienes implementaron una técnica de diagnóstico molecular para determinar microdeleciones, utilizaron un total de 16 marcadores moleculares STSs, con los que se realizó ensayos de PCR para descartar microdeleciones, tomando muestra de sangre de 13 hombres infértiles con presencia de oligozoospermia severa, o azoospermia no obstructiva, lograron estandarizar la prueba para la amplificación de 16 marcadores en hombres fértiles³⁹,

Otro estudio ya había revisado el estado del arte, comparando técnicas moleculares y apoyadas en laboratorios de Europa, estableciendo el control y calidad, utilizados para la identificación de las deleciones del cromosoma Y, que permitiera, protocolizar las guías o procedimientos para detectarlas. Otros autores han propuesto identificación molecular de deleciones del cromosoma Y mediante métodos diversos, con el fin de establecer técnicas a bajo costos y adecuada efectividad en ese objetivo⁴⁰.

Al comparar pruebas, el ADN extraído de células bucales, con ADN obtenido de sangre, mediante PCR múltiplex, para una población de 18 pacientes previamente diagnosticados con microdelección del cromosoma Y, se encontró baja efectividad para el equipo comercial utilizado en ADN de células bucales, sin embargo, el contenido y tipo de ADN se

recomendó, como un método sencillo eficaz y de bajo costo en la determinación de las microdeleciones⁴¹. Otro estudio presentó opciones de análisis de microdeleciones del cromosoma Y con técnicas de hibridación de PCR, para analizar los AZF a y b, el análisis se efectuó en 76 pacientes que presentaron delección del Yq usando 18 STS y dos pruebas de DNA⁴⁶

Teniendo en cuenta que las microdeleciones de segmentos AZF no responderían a posibilidades reproductivas naturales, múltiples estudios proponen técnicas asistidas para lograr este objetivo, que dependiendo del tipo de delección, será el método a utilizar. Casos de pacientes con azoospermia pueden recurrir a técnicas de reproducción asistida a través de donantes, mientras que en oligozoospermia severa se recuperan espermatozoides para técnicas de reproducción asistida, inseminación artificial e ICSI. La inseminación artificial es el procedimiento de reproducción asistida más común, de bajo costo, ausencia de bajas complicaciones; la inseminación de donantes a reducido drásticamente su frecuencia dada la aparición de las nuevas técnicas de ICSI⁴⁷ una nueva oportunidad futura se presenta con el uso de la crío conservación de espermato⁴⁴

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de prevalencia, que busca identificar casos y tipos de microdeleciones del cromosoma Y en hombres infértiles

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo conformada por 33 hombres con diagnóstico previo de infertilidad, seleccionados en los centros de atención de fertilidad y consultorios urológicos de las ciudades de Barranquilla y Sincelejo, que cumplieran con los criterios de selección, por lo tanto el muestreo obedeció a métodos no probabilístico o intencional. Teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Escogencia de casos de centros de atención de fertilidad de las ciudades de Barranquilla y Sincelejo, Procrear y Dr. Fernando Vásquez (Barranquilla) y Profamilia y consultorio del Md urólogo Vitaliano Urzola (Sincelejo); el rango de edad fue entre 20 y 50 años y de sexo masculino,

- El análisis de los criterios de inclusión permitió establecer como población de estudio: hombres con Azoospermia no obstructiva y oligozoospermia (menos de 12 mill/ml), criterios definidos mediante el análisis de semen y que no presentaran patologías subyacentes como comprobada causa primaria de infertilidad
- Se estableció contacto con los pacientes seleccionados a quienes se les explicó el tipo de estudio a efectuar y se les invitó a participar voluntariamente en el mismo, previo consentimiento informado (Anexo N° 1), de acuerdo a criterios éticos contemplados en la resolución 008430 de 1993 (literal e del artículo 6°)

5.3 MÉTODOS

Los métodos utilizados, responden a los propuestos en otros estudios^{30,34,46} que buscaron la identificación de la microdelección del cromosoma Y y que se estructuran en una serie de pasos secuenciales; realizados en dos oportunidades buscando con ello corroborar fidelidad en los hallazgos. En orden cronológico fueron:

5.3.1 ***Extracción de muestra de sangre periférica:*** 5 ml colectados en tubo con EDTA

5.3.2 ***Extracción de DNA,*** Se siguió el protocolo de aislamiento de ADN en sangre, del laboratorio Mo-Bio, realizado en cabina de flujo laminar para preservar la integridad y limpieza del producto. A 330 µl de sangre, se le agregó

900 µl de solución de cloruro de amonio, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 segundos a 13.000 revoluciones por minuto, luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió en vórtex durante 5 segundos, al pellet obtenido se le agregaron 300 µl de detergente, para luego adicionar 1.5 µl de RNase, se agregó 100 µl de acetato de amonio, una vez precipitadas las proteínas, se mezcló durante 15 seg, se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm, luego de transferir el sobrenadante a otro tubo (conteniendo el ADN), se agregó 300 µl de isopropanol, homogenizada la solución, se centrifugó para luego descartar el sobrenadante y obtener las moléculas de ADN, las que se sometieron a lavado con 300 µl de etanol, se centrifugó durante 30 segundos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante, por último se adicionó la solución Tris para separar las moléculas de ADN, producto final que fue incubado a 65°C, durante 40 minutos

5.3.3 **Cuantificación de ADN:** utilizando espectrofotómetro modelo Biomate 3, marca thermoelectron como cuantificador de ADN, se procedió a obtener la cantidad necesaria para llevar a cabo los procedimientos de PCR, dicha cuantificación fue realizada en dos oportunidades respondiendo al procedimiento de nueva extracción de ADN. Obtenida la

concentración final de cada muestra, se procedió al próximo paso.

5.3.4 **PCR MULTIPLEX:** cuantificada la concentración de ADN, de cada caso en estudio, se procedió a tomar las cantidades necesarias para cada PCR, partiendo del protocolo Promega (casa comercial Promega Corporation) que establece una cantidad de 10ng/ μ l de ADN diluido en agua, hasta lograr una dilución de 5 μ l por reacción, o sea, un total de 25 μ l, de tal forma que pueda luego, dividirse para las cinco reacciones, sin embargo, con el fin de lograr una cantidad mayor, para reponer pérdidas de diluciones por gotas en paredes de tubos, de pipetas o pérdida accidental, se preparó una cantidad de 30 μ l.

Preparada la cantidad de dilución de ADN, se pasó a la preparación de las diluciones de reactivos o juegos de iniciadores para las PCR múltiplex (A, B, C, D, y E, con 20 μ l de máster y 0,2 μ l de Taq polimerasa por muestra) o sea, siete tubos en total incluyendo control positivo y control negativo; se agregó la cantidad resultante a cada tubo que contenía la dilución de ADN, se mezcló suavemente, quedando los tubos para cada reacción y cada multiplex listos para procesar en el termociclador, Icycler, marca Bio-Rad, previa configuración del programa para

microdeleciones del cromosoma Y; por último se procedió a procesar las muestras en el equipo, para obtener los STSs (*sequence target sites*) determinadas por el kit así:

AZFa: SY81 = DYS273, SY85 = DYS148, SY182 = KALY

AZFb: SY121 = DYS212, SYPR3 = SMCY, SY124 = DY215, SY127 = DYS218, SY128 = DYS219, SY130 = DYS221, SY133 = DYS223, SY134 = DYS224

PROXIMAL AZFc/AZFd: SY145 = DYF51s1, SY152 = DYS236

AZFC: SY242 = DAZ, SY208 = DAZ, SY254 (DAZ), SY255 = DAZ, SY157 = DYS240

El protocolo del termociclador, fue el siguiente: 94°C por 2 minutos, 94°C por un minuto, 57°C por 30 segundos; 72° C por 5 minutos a 35 ciclos, luego 72°C por 5 minutos y 4°C finales, para un total de tiempo de 2,6 horas de amplificación de productos de ADN, que incluye proceso de desnaturalización y extensión final

5.3.5 ***Corrido electroforético en gel de agarosa:***

Una vez amplificados y obtenidos los productos de PCR, se pasó al corrido electroforético en gel de agarosa, el protocolo recomienda el uso de gel al 4% pero probados los resultados iniciales, se procedió a reducir la concentración al 3,5%; el procedimiento se

llevó a cabo de la siguiente forma: se cuantificó la concentración de agarosa, se procedió a su gelatinización, luego se le adicionó bromuro de etidio, sustancia que debido a sus propiedades fluorescentes, cuando se expone a la luz ultravioleta permite la visualización de los productos de PCR, al intercalarse con las cadenas de ADN; luego se polimerizó en soporte sellado durante 30 minutos, se trasladó a la cámara de corrido electroforético, donde se hizo la siembra de 10 μ l de muestra de ADN, adicionando a cada una 5 μ l de tampón de carga, como colorante que hace que la muestra sea fácil de visualizar, además, por ser denso permite que ésta caiga dentro del pocillo y evitar que flote o se salga del depósito; luego se cubrió la cubeta, se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se efectuó el corrido a 80 voltios durante 1,5 horas.

5.3.6 Visualización de bandas génicas: Efectuado el corrido electroforético se procedió a visualizar los resultados, mediante Bio documentador, modelo Biodoc-it, marca Bio Rad, registrando la información en el formato anexo N° 2, se consideró la muestra positiva cuando el producto amplificado, de acuerdo al peso molecular, estuvo presente y negativa cuando el producto esperado estuvo ausente.

6. RESULTADOS

Haciendo uso de los métodos descritos, extracción y cuantificación de de ADN, PCR múltiplex, corrido electroforético en gel de agarosa y visualización a través de fotodocumentador, se llegó a los resultados de los diferentes STSs estudiados para microdeleciones del cromosoma Y, corresponden a:

AZFa: SY81 = DYS273, SY85 = DYS148, SY182 = KALY

AZFb: SY121 = DYS212, SYPR3 = SMCY, SY124 = DY215, SY127 = DYS218, SY128 = DYS219, SY130 = DYS221, SY133 = DYS223, SY134 = DYS224

PROXIMAL AZFc/AZFd : SY145 = DYF51s1, SY152 = DYS236

AZFc: SY242 = DAZ, SY208 = DAZ, SY254 (DAZ), SY255 = DAZ, SY157 = DYS240

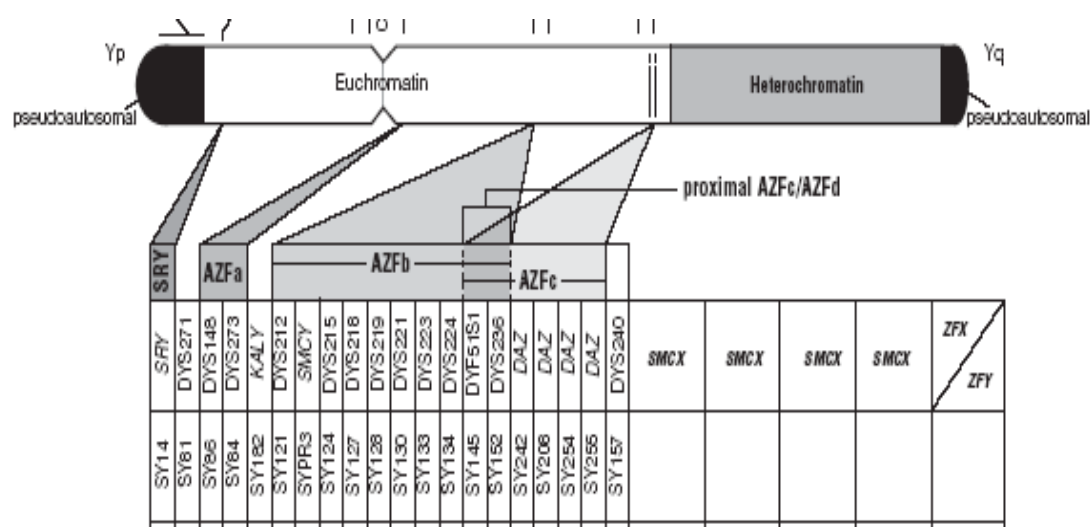
FIGURA 4: UBICACIÓN DE LAS REGIONES AZF DEL CROMOSOMA Y, 2009



Los STSs de las diferentes regiones AZF, está conformada por un número específico de genes, su delección puede llevar a anormalidades en la espermatogénesis, con la consecuente alteración en presencia y/o cantidad de espermatozoides, generando alteraciones en la reproducción masculina.

Los genes analizados, mediante PCR multiplex, contenidos en cada STSs, por cada Multiplex máster mix A (DAZ, DYS240, DYS271, DYS221, KAL-Y, y control interno SMCX); Multiplex máster mix B (SMCY, DYS218, DAZ2 Y DAZ3, y control interno SMCX); Multiplex máster mix C (DYS219, DYS212, DYF51S1, DAZ4 Y control interno SMCX); Multiplex máster mix D (DYS223, DYS236,DYS215, y control interno SMCX) y Multiplex máster mix E (SRY, DYS224, DYS148, DYS273 y control interno ZFX/ZFY) (Figura N° 5)

FIGURA N° 5: GENES ESTUDIADOS EN LAS DIFERENTES REGIONES DE AZOOSPERMIA DEL CROMOSOMA Y. 2009



El estudio “**Determinación de microdeleciones de regiones AZF del cromosoma Y e infertilidad**” cuyo objetivo buscó determinar la prevalencia y tipo de microdeleciones de las regiones AZF del cromosoma Y en hombres infértiles, contó con la participación de 33 casos, el 66% de la ciudad de Barranquilla y el 33% de la ciudad de Sincelejo, todos ellos ingresaron al estudio previo diagnóstico de infertilidad de pareja; sus causas son múltiples y pueden tener origen pre-testicular, testicular o pos-testicular; las microdeleciones del cromosoma Y, son de origen **testicular**. Como fue descrito en la metodología se tuvo en cuenta los criterios de inclusión relacionados con Azoospermia no obstructiva y oligozoospermia moderada y severa, que de acuerdo al estado del arte, nos aproxima a resultados más exactos, pues nos indican el grado de alteración del proceso de espermatogénesis en hombres.

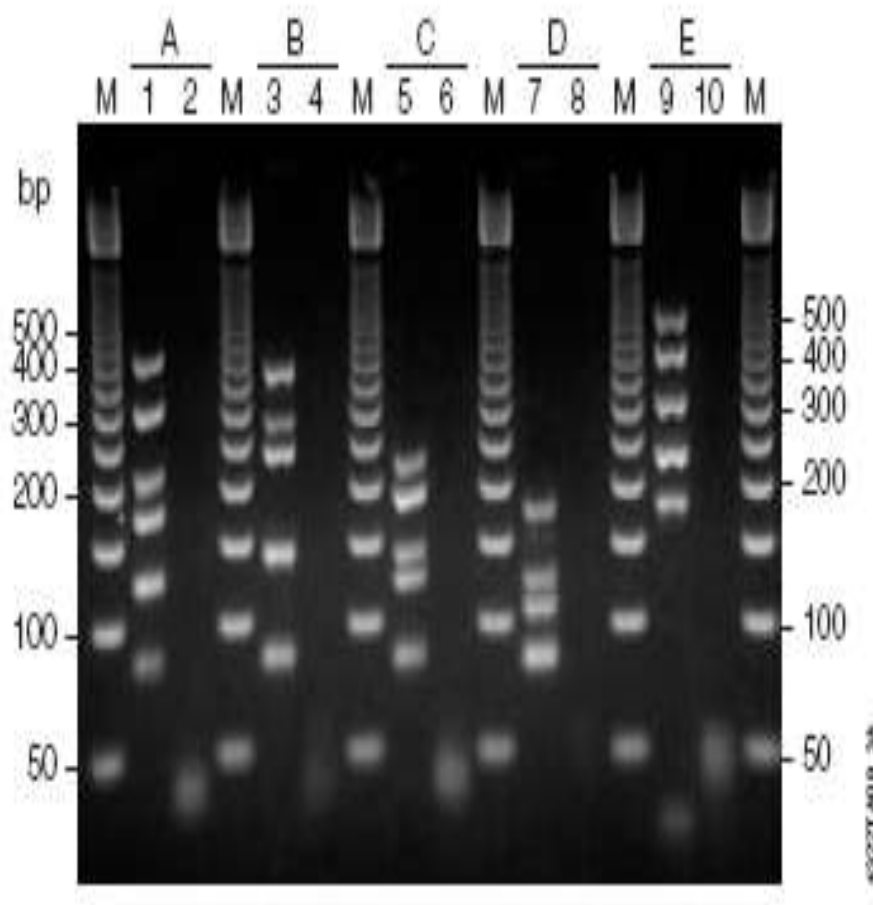
TABLA N° 1: DISTRIBUCIÓN DE CASOS DE ACUERDO A CONTEO ESPERMÁTICO, 2009

VARIABLE	Nº	F1
Azoospermico	18	54,54
Oligozoospermico	15	45,45
Total	33	100

Fuente: Relación de casos estudiados, 2008

De acuerdo a conteo espermático, el 54,54% de los casos estudiados presentaron azoospermia y el 45,45% oligozoospermia (menos de 12 millones de espermatozoides por ml)

**FIGURA N° 6: PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PCR
MULTIPLEX A, B, C, D, Y E MICRODELECCIÓN DEL CROMOSOMA
Y, 2009**

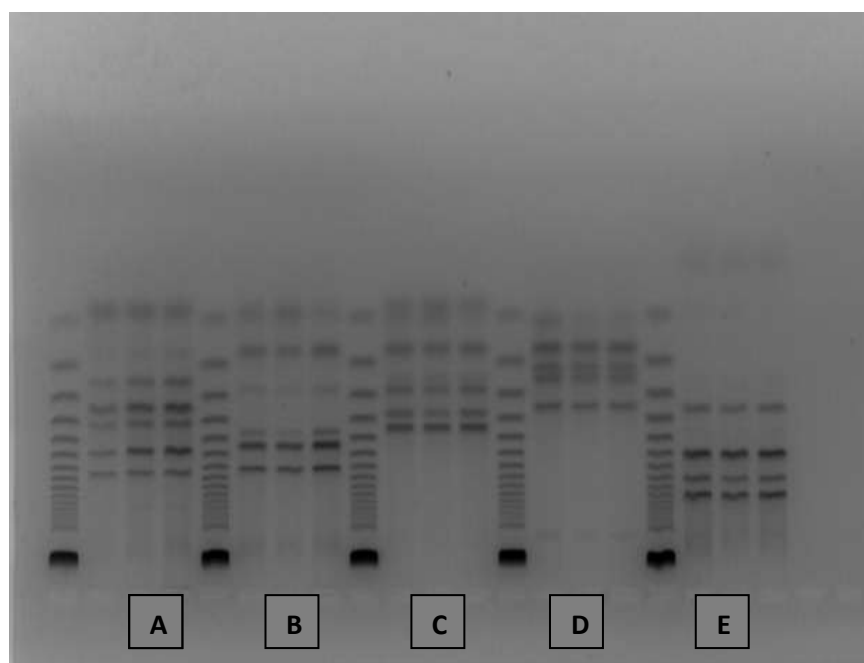


Fuente: Protocolo Promega, sistema de detección del deleciones cromosoma Y, versión 2, 2008

El producto de PCR Multiplex, de los diferentes juegos de iniciadores, A,B,C,D y E, del kit de promega, utilizados para el procesamiento de las muestras de ADN, muestran (M) marcador de peso molecular desde 500 a 50 pares de bases; (1) control positivo y (2) control negativo. (Figura 6)

Los hallazgos del presente estudio revelaron que 32 de los 33 casos, analizados, o sea, el 94.97% fue normal para estudio de microdeleciones del cromosoma Y, en las diferentes regiones AZF a, b, c y proximal AZFc/AZFd y solo el 3,03% resultó con microdelección de los genes de la familia DAZ y DYS240, significando una delección para todos los genes estudiados en la región AZFc.

Figura 7: PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN PCR MULTIPLEX PARA LOS CASOS DE INFERTILIDAD 1 AL 3, 2009

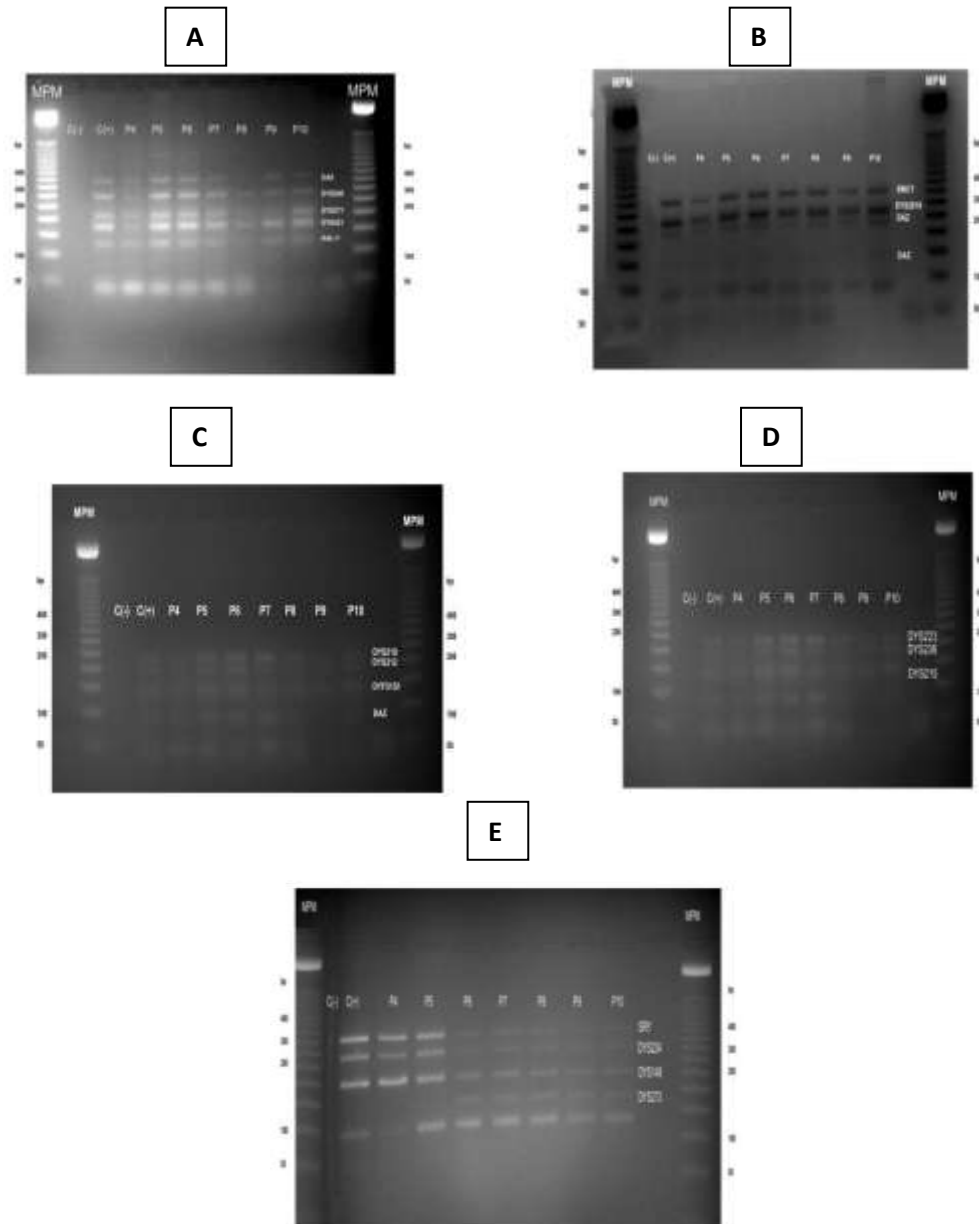


Fuente: Producto de PCR, casos 1 al 3. 2008

Figura 7: Análisis de STSs de DNA de hombres infértiles casos 1 al 3, Multiplex A : STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (DYS240) 290 pb; SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCX de 83 pb; B: multiplex B máster mix, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; SY208 (DAZ) de 140 pb; y el control interno de 83 pb, C: Multiplex Master Mix C que analiza los STSs SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb y el control

interno de 83 pb. **D:** Multiplex Máster Mix que analiza los STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb. **E:** Multiplex Máster Mix E que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así: SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224) de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 pb.

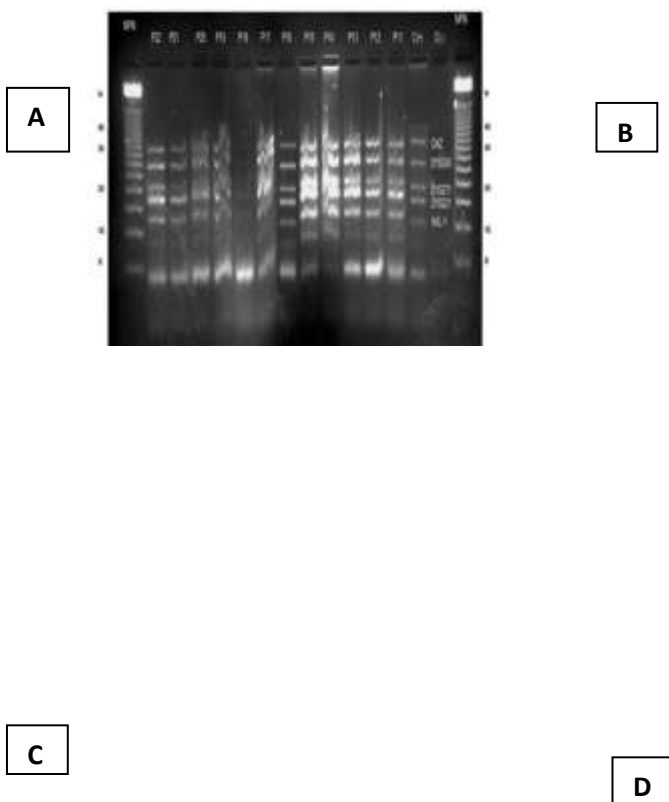
FIGURA Nº 8: PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN PCR MULTIPLEX PARA LOS CASOS DE INFERTILIDAD 4 AL 10, 2009



Fuente: productos de PCR, casos 4 al 10

Figura 8: Análisis de STSs de DNA de hombres infértiles casos 4 al 10, **A:** Multiplex A : STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (DSY240) 290 pb; SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCX de 83 pb; **B:** multiplex B máster mix, casos 4 al 10, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; SY208 (DAZ) de 140 pb; y el control interno de 83 pb, **C:** Multiplex Máster Mix C que analiza los casos 4 al 10 STSs SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb y el control interno de 83 pb. **D:** Multiplex Máster Mix que analiza los casos 4 al 10 STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb. **E:** Multiplex Máster Mix E que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así: SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224) de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 pb.

FIGURA Nº 9: PRODUCTO DE PCR MULTIPLEX PARA LOS CASOS DE INFERTILIDAD 11 AL 22, 2009



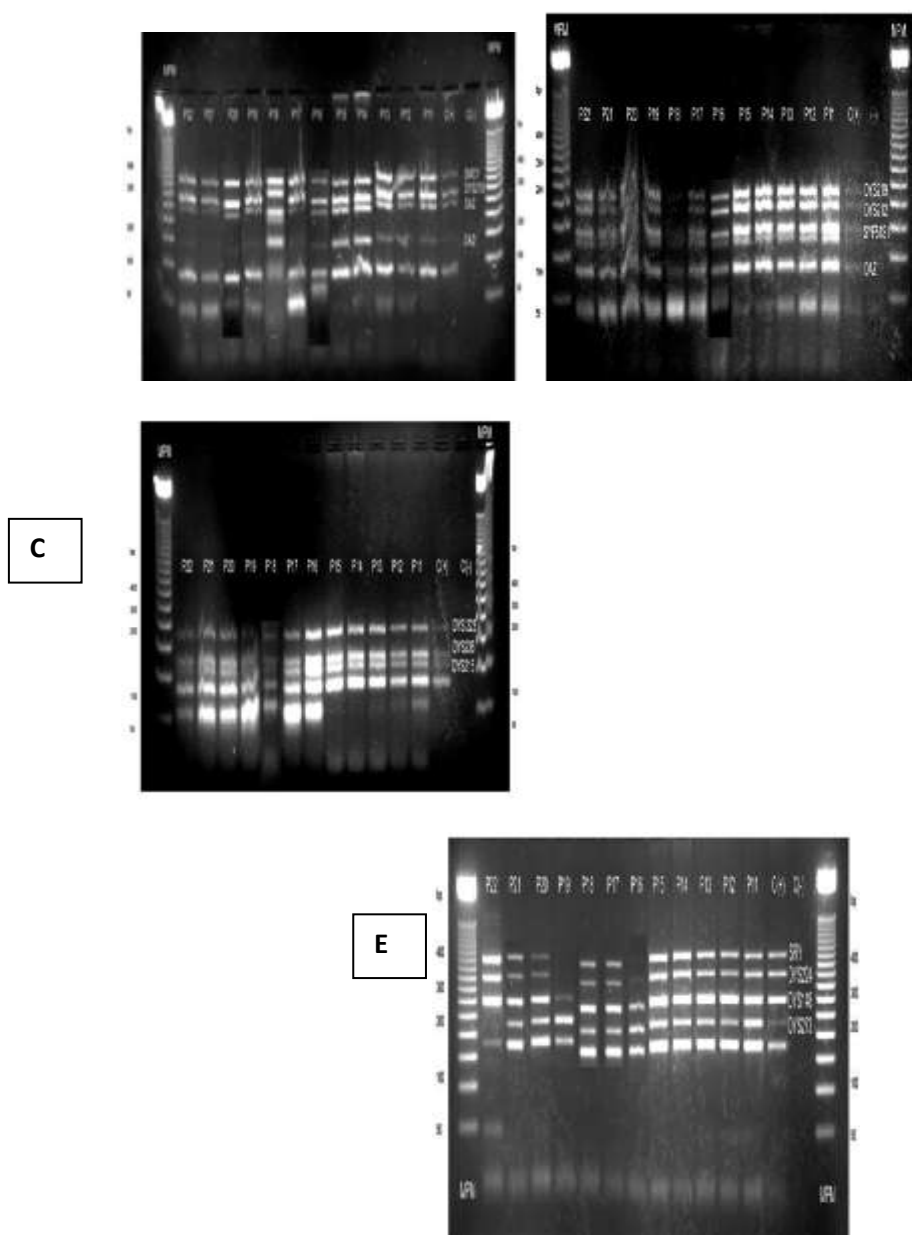


Figura 9: Análisis de Sets de DNA de hombres infértiles casos 11 al 22, A: Multiplex A : STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (DSY240) 290 pb; SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCX de 83 pb; B: multiplex B máster mis, casos 11 al 22, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; SY208 (DAZ) de 140 pb; y el control interno de 83 pb, C: Multiplex Máster Mis C que analiza los casos 11 al 22 Sets SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb y el control interno de 83 pb. D: Multiplex Máster Mix que analiza los casos 11 al 22 STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb.. E: Multiplex Máster Mis E de los casos 11 al 22, que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así:

SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224) de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 pb.

FIGURA Nº 10: PRODUCTO DE PCR MULTIPLEX PARA LOS CASOS DE INFERTILIDAD DEL 23 AL 28, 2009

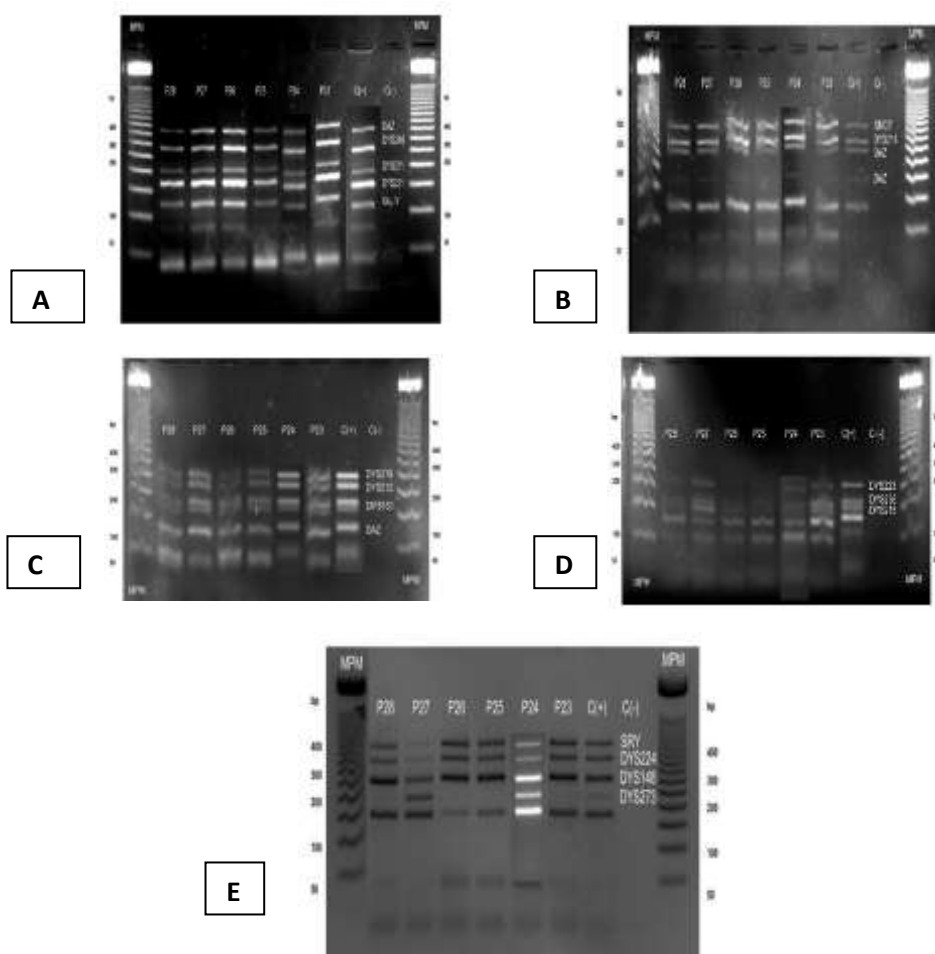


Figura 10: Análisis de STSs de DNA de hombres infértiles casos 23 al 28; A : multiplex máster A STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (DSY240) 290 pb; SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCX de 83 pb; B: multiplex B máster mix, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; SY208 (DAZ) de 140 pb; y el control interno de 83 pb, C: Multiplex Master Mix C que analiza los STSs SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb y el control interno de 83 pb. D: Multiplex Máster Mix que analiza los STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb. E: Multiplex Máster Mix E que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así: SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224)

de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 pb.

FIGURA N° 11: PRODUCTO AMPLIFICACIÓN PCR MULTIPLEX DE LOS CASOS DE INFERTILIDAD 29 -30-32 Y 33, 2009

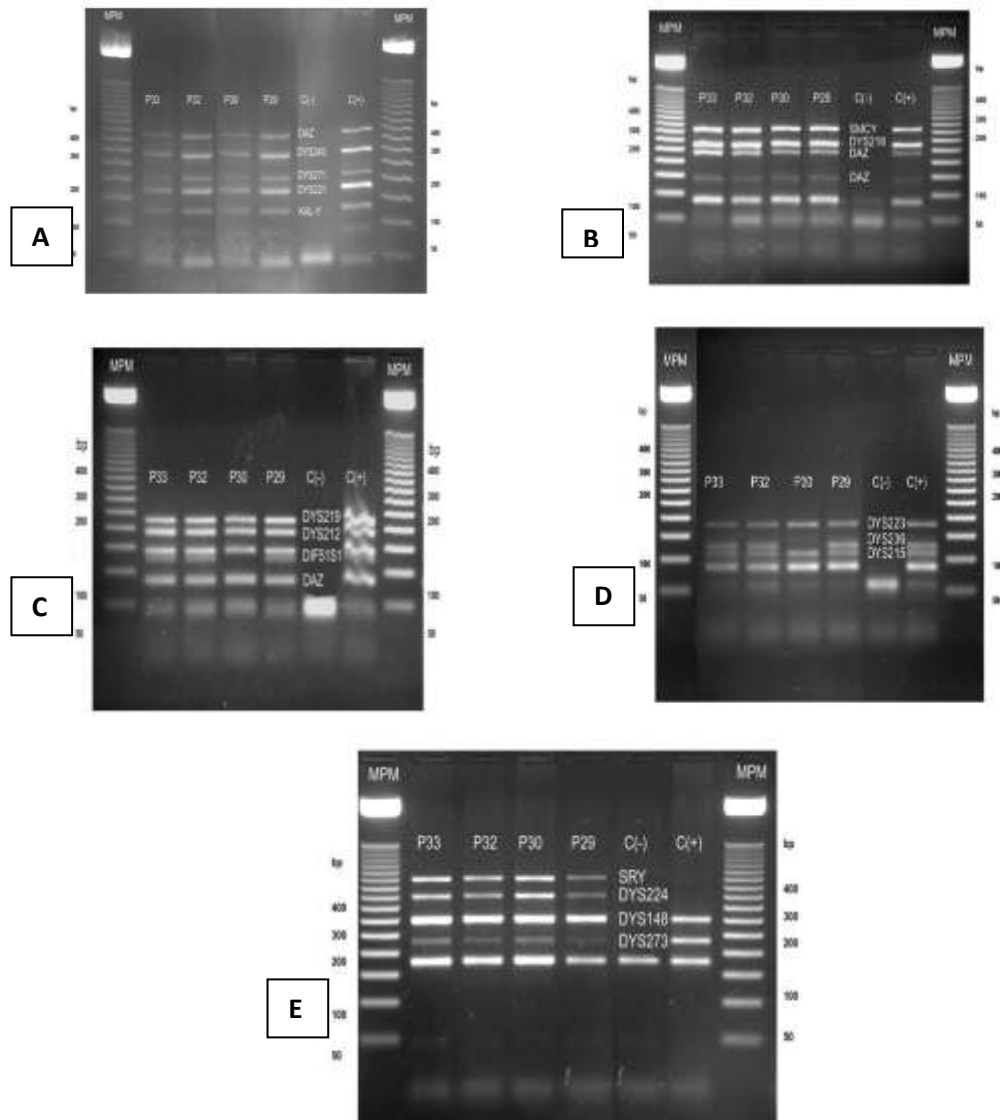
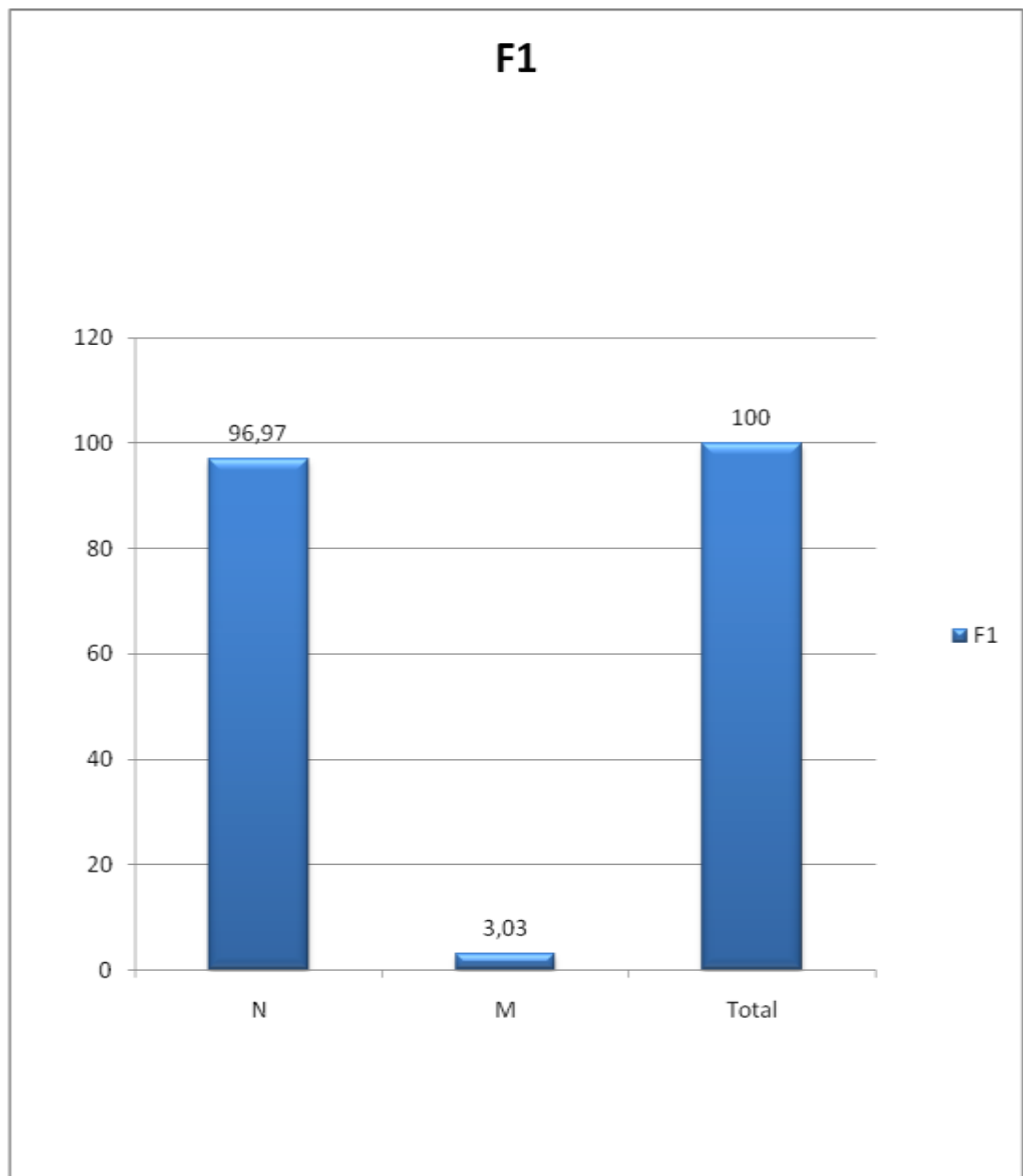


Figura 11: Análisis de STSs de DNA de hombres infértiles casos 29, 30, 32 y 33, A: Multiplex A : STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (DSY240) 290 pb; SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCY de 83 pb; B: multiplex B master mix, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; SY208 (DAZ) de 140 pb; y el control interno de 83 pb, C: Multiplex Master

Mix C que analiza los STSs SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb y el control interno de 83 pb. D: Multiplex Máster Mix que analiza los STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb. E: Multiplex Máster Mix E que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así: SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224) de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 p.

En los casos 1 al 30, 32 y 33, se observó presencia de todas las bandas génicas de acuerdo a los STSs estudiados, tanto para máster A, B, C, D y E, ubicándose en la categoría de negativo para microdelección del cromosoma Y.

**FIGURA Nº 12: PROPORCIÓN DE MICRODELECCIONES DEL
CROMOSOMA Y, 2009**



La proporción de normalidad, o con presencia de todas los STSs estudiados para microdelección, fue del 96,97%, mientras que el 3.03 % presentó microdelección del cromosoma Y.

FIGURA Nº 13: PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN PCR MULTIPLEX PARA EL CASO DE INFERTILIDAD 31, 2009

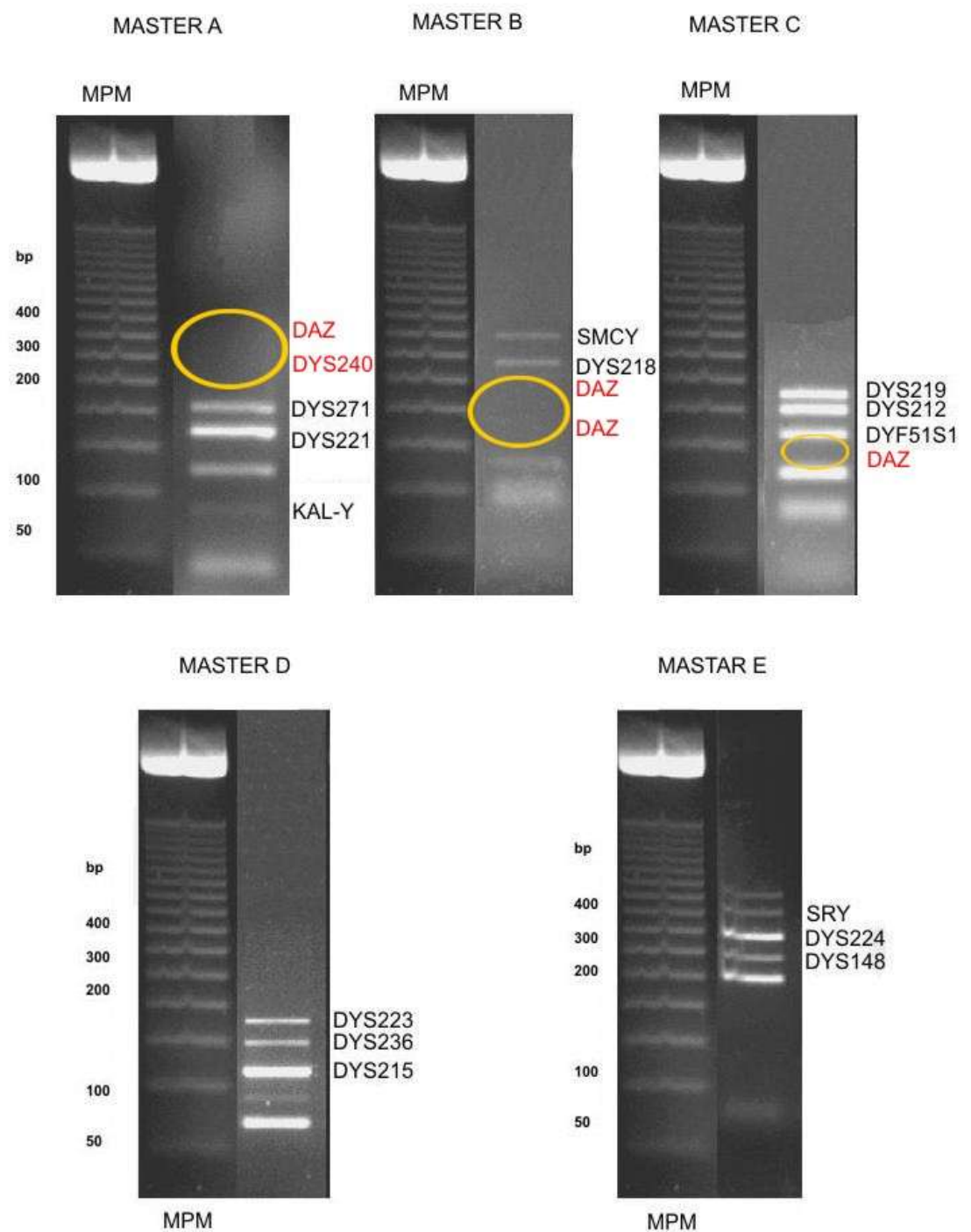


Figura 13: Análisis de STSs de DNA de hombres infértiles caso 31, A: Multiplex A : STS SY254, (DAZ) de 380 pb, SY157 (ausente) (DSY240) 290 pb (Ausente); SY81 ((DYS271)209 pb; SY130 (DYS221) 173 pb; SY182 (KAL-Y) 125 pb y el control interno para los mismos, SMCX de 83

pb; B: multiplex B máster mix, que analiza los STS con sus respectivos locus así: SYPR3 (SMCY de 362 pb; SY127 (DYS218) de 274 pb; SY242 (DAZ) de 233 pb; (Ausente); SY208 (DAZ) de 140 pb(Ausente); y el control interno de 83 pb, C: Multiplex Máster Mix C que analiza los STSs SY128 (DYS219 de 228 pb; SY12 (DYS212) de 190 pb; SY145 (DYF51S1) de 143 pb; SY255 (DAZ) de 124 pb (Ausente) y el control interno de 83 pb. D: Multiplex Máster Mix que analiza los STSs: SY133 (DYS223) de 177 pb; SY152 (DYS236) de 125 pb; SY124 (DYS215) de 109 pb; y el control interno igualmente de 83 pb. E: Multiplex Máster Mix E que analiza el control interno ZFX/ZFY De 496 pb, y los STS con sus respectivos locus así: SY14 (SRY) de 400 pb, SY134 (DYS224) de 303 pb; SY86 (DYS148) de 232 pb y el SY84 (DYS273) de 177 p.

Es evidente la ausencia de los genes de la familia DAZ, los STSs ausentes fueron SY254, SY157, SY242, SY208, SY255 y SY152, señalados en los círculos amarillos, mostrando delección completa de AZFc, todos ellos a partir del máster A, B y C. con presencia de locus SRY y positividad en los controles internos, confirmando de esa forma la reproducibilidad del producto obtenido por PCR. Se presentan todas las bandas estudiadas para los juegos de iniciadores máster D y E.

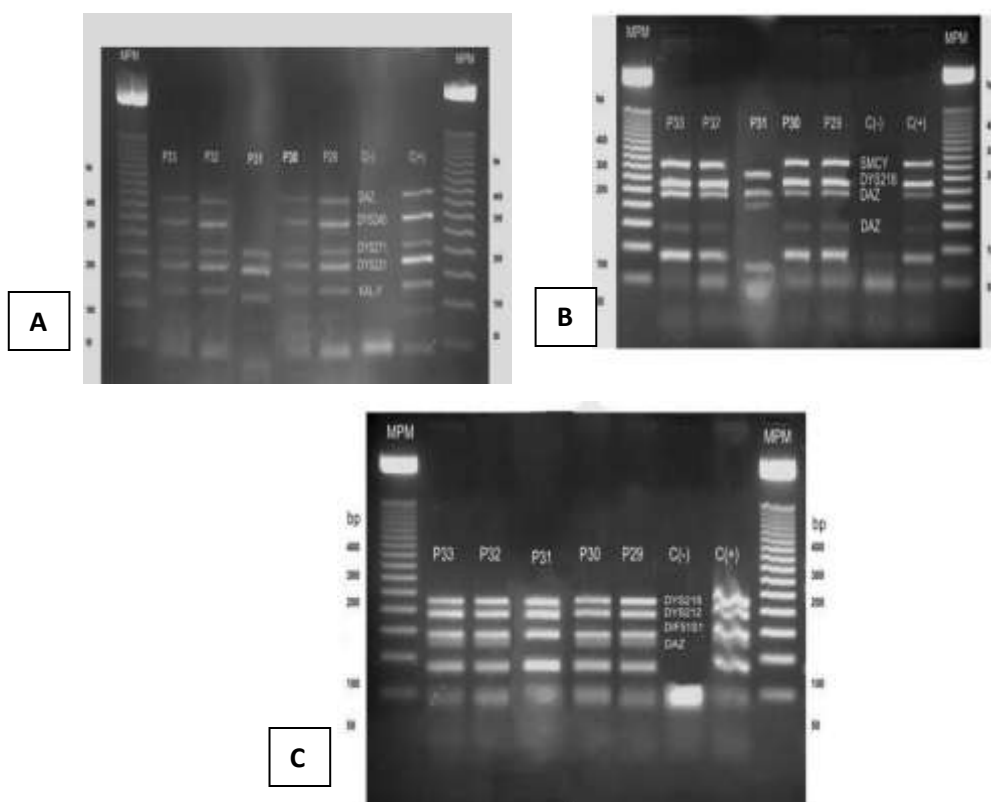
El caso reportado es un trabajador dedicado a labores docentes, peso 100 kgs, estatura: 1,78 cms, con antecedentes de azoospermia secretora, varicocele izquierdo sometido a procedimiento quirúrgico en el 2004, órganos sexuales normales, al examen físico se encuentra paciente con tamaño de pene normal, testículos de buen tamaño, consistencia normal, ubicación escrotal normal, epidídimo normal, presencia de vasos deferentes, ausencia de várices e hidrocele. La biopsia testicular reporta túbulos seminíferos con ausencia de células germinales en un 80% y células germinales sin maduración en un 20%

FIGURA N° 14: REGIONES DE AZOOSPERMIA AZF DEL CROMOSOMA Y; AZFC DELECIDONADO Y SU COMPARACIÓN CON EL PRODUCTO DE PCR MULTIPLEX MÁSTER MIX



La figura 14 ilustra los espacios correspondientes a cada región AZF, la delección completa de los genes de la región AZFc, concordante con los locus, por juego de iniciadores A: DAZ (380 pb) y DYS240 (290 pb), juego de iniciadores B: DAZ (233pb), DAZ (149pb), juego de iniciadores C: DAZ (124 pb) y D DYS236 (125 pb) y su comparación con el producto de PCR multiplex. La posición de las microdelecciones en el mapa del cromosoma Y corresponde secuencialmente a los sitios 16, 17, 18, 19 y 20, lo que confirma la delección de todos los genes de la región AFZc estudiados

FIGURA Nº 15: PRODUCTO DE PCR MULTIPLEX COMPARATIVO, ENTRE CUATRO CASOS CON PRESENCIA DE BANDAS COMPLETAS Y UN CASO POSITIVO DE MICRODELECCIÓN DEL CROMOSOMA Y, 2009



Para mayor ilustración se presenta el multiplex máster Mix A B y C, en cada uno se observa: de derecha a izquierda Columna 1: (Marcador de peso molecular) Columna 2: (Control positivo) Columna 3: (control negativo), Columna 4: (caso N° 29), Columna 5: (Caso N° 30), columna 6: (Caso N° 31), columna 7: (caso N° 32) y columna 8 (caso N° 33), se evidencia en cada uno de los máster que en el caso N° 31 están ausentes: en A (las dos primeras bandas génicas, correspondientes a DAZ¹ y DYS240, de los STS DYS254 y DYS157 respectivamente), en máster B (la tercera y cuarta bandas génicas, correspondiente a DAZ2 y DAZ3 de los STSs SY242 y SY208 respectivamente) y el máster C (la cuarta banda génica correspondiente DYS232 de el STS DY152) concluyendo claramente microdeleción, de cinco (5) bandas génicas en el caso 31.

Es importante anotar que el caso reportado consultó por infertilidad, presentando azoospermia no obstructiva y la ausencia de cinco STSs sugiere que a mayor pérdida de genes DAZ mayor compromiso de la espermatogénesis, arriesgando el futuro reproductivo del paciente.

Además, el paciente presenta varicocele de testículo izquierdo, órganos sexuales normales en tamaño, consistencia, ubicación, y vasos deferentes. A la biopsia testicular túbulos seminíferos con ausencia de células germinales en un 80% y células germinales sin maduración en un 20%.

7. DISCUSIÓN

El cromosoma Y está relacionado especialmente con la función espermática y determinación del sexo. A través de estudios de mapeos del gen SRY, se descubrió la presencia de varios genes distribuidos en las denominadas regiones de azoospermia. Las deleciones del AZFc, que involucra al gen DAZ es más frecuente observarla en fenotipos relacionados con hipoespermatogénesis que en Síndrome de Solo Células de Sertoli (SCO). Esto sugiere que la deleción del mismo no es suficiente para ocasionar la pérdida completa de la espermatogénesis. La pérdida de la región AZFb está relacionada con cambios en el fenotipo testicular, aparentemente, con menor compromiso de la espermatogénesis y la ausencia del gen DFFRY del AZFa se asocia con un compromiso mayor del fenotipo testicular²⁹

La frecuencia de microdeleción encontrada fue de 3.03% correspondiente a un caso del total de población analizada. Fernández Salgado en el 2006, presentó la estadística de otros resultados a nivel mundial, reportando una frecuencia de deleciones en: Alemania 3,2% (12/370), 1,3% (19/1470), Suecia 2% (4/192), Países bajos y Bélgica 2,3% (37/1627), Irlanda 3,6% (2/56) y Eslovenia 4,4% (9/226) entre otros (31)²⁰

Tiepolo y Zuffardy en 1976, al investigar a 1160 hombres infértiles, a los que se realizó cariotipo, logró detectar la deleción de los diferentes AZF, en el 0.5%, de los casos. Las deleciones completas del AZFa fueron

presentadas por Kamp C, Hullen K, Fernández S en el 2001, con una prevalencia del 9% aproximadamente³⁰

Mientras que en 180 pacientes infértiles, afectados con síndrome de solo células de sertoli (SCO) y diferentes grados de hipoespermatogénesis, la prevalencia de deleciones fue del 34,5% y 24,7% respectivamente. Las deleciones en AZFc comprometieron al gen DAZ en 17 pacientes de 40 (42,5%). 61,9% de 21 pacientes con hipoespermatogénesis y 21% de 19 con síndrome de solo células de sertoli (SCO), las deleciones que involucró al gen RBM fue de 5% y la deleción del Gen DFFRY se presentó en el 12,5% de los 40 pacientes²⁷.

Carlo Foresta, en el 2007 identificó 99 casos de infertilidad, de un total de 3073 hombres diagnosticados previamente con infertilidad, de estos 99 casos 3,2% de hombres sin criterios específicos de inclusión, el 8,3% hombres con azoospermia no obstructiva y el 5,5% hombres con oligozoospermia severa³⁸. Aún moviéndose en los valores estadísticos reportados, las diferencias entre números de casos, puede estar relacionada con factores de diversas índole, tales como tamaño muestral, fenómenos de variabilidad genética, factores ambientales, ocupacionales y biológicos del entorno; criterios de inclusión de los casos seleccionados; entre otros. Los estudios de investigación donde se ha tenido en cuenta criterios precisos de inclusión de pacientes (Azoospermicos, Oligozoospermicos), han demostrado mayor prevalencia de alteraciones relacionadas con microdeleción del cromosoma Y, que en los estudios que no tienen en cuenta dichos criterios.

La deleción de la región AZFc, del caso positivo para microdeleción en el presente estudio, corresponde a los STSs, SY254, SY157, SY242, SY208, SY255 y SY152, para una deleción completa del AZFc, resultado

que es compatible con otros estudios, donde se encontró compromiso de genes de la “familia DAZ”; como es el caso de Tessari A, 2004, que además de las deleciones que involucraron al gen RBM y DFFRY, se evidenció microdeleciones en genes de la familia DAZ;²⁷. Al analizar 39 pacientes con síndrome de solo células de sertoli (SCO), de igual forma el fenotipo de testiculopatías severas idiopáticas, fue relacionado con ausencia de expresión del gen DAZ²⁸, mientras que Saut Noemie en el 2000, concluyó que además del gen DAZ, en las deleciones del AFZc participan los genes BPY2 y el CDY1. Un estudio llevado a cabo en poblaciones de origen étnico chino, se identificó seis casos de deleciones del cromosoma Y, específicamente en AZFc, incluyendo al gen DAZ.⁹ Otro estudio llevado a cabo, en población China, demostró microdeleción del gen DAZ en pacientes con oligozoospermia o azoospermia no obstructiva²⁴.

Un nuevo estudio detectó ausencia de los STS sY117, sY127 y sY143, siete pacientes mostraron resultados que indicaban deleciones en las regiones AZFb y c, con ausencia de sY117, sY127, sY143, el último hombre tenía los STS de los siete anteriores menos el sY117³¹. La deleción del gen DAZ del AZFc, fue encontrada con mayor frecuencia en pacientes con hipoespermatogénesis que en pacientes con SCO, lo que sugiere que una deleción en este gen no es suficiente para causar una completa pérdida de la espermatogénesis²⁹. Es mayor la frecuencia de microdeleciones en pacientes azoospermicos que en oligozoospermicos severos, comprometiendo la región AZFc en el loci de la familia del DAZ³⁸

Un estudio sobre evolución del cromosoma Y, estableció que en los haplogrupos se presentan diferentes haplotipos para el gen DAZ⁵³,

cuyos genes son afectados⁵³, posiblemente por poseer un número variable de copias⁵⁴. Se cree que el gen DAZ tuvo su origen en el DAZL, conocido inicialmente como DAZLA logrando su transformación evolutiva desde los primates antepasados hace mas de 20.000 mil años como producto de un fenómeno de cuello de botella provocado en los glaciares.²⁵ El gen DAZ pertenece a una familia de genes presentes en copias casi idénticas, sin que se tenga un claro conocimiento del número de copias del mismo³⁵. Un estudio propuesto por René Reijo, 2000 analizó la presencia de la proteína del gen DAZ y GAZL en dos especies de mamíferos encontrando nueve (9) repeticiones en tandem, para el gen DAZ, sin que se haya proporcionado evidencia de que el número de copias sea exacto para hombres diferentes⁵⁶, aunque se ha descrito que la relación entre fenotipo testicular y la presencia de microdeleciones de AZFc en infertilidad, pueda deberse a un mayor número de genes en esta región⁵⁵.

El gen DAZ está presente tanto en hombres fértiles como infértiles y son precisamente, los haplotipos de cada haplogrupo, los que proporcionan información de su diferencia en los diferentes grupos, lo que indica una asociación evidente entre los haplogrupos del cromosoma Y con los haplotipos del gen DAZ, por lo que la identificación de los haplotipos de este gen, resulta de gran interés para el avance de las investigaciones, en microdelección del cromosoma Y, como factor causal de infertilidad⁵³. Otros estudios como los desarrollados por Kamischke Gromoll en el 1999, Ferlin A en el 1999, Ferras C en el 2004, identificaron deleciones de genes de la familia DAZ, los resultados de dichos estudios han hecho un gran aportes al estudio de la infertilidad masculina.

El paciente, que presentó la microdeleción, de la región AFZc, de acuerdo a conteo espermático, es Azoospermico; estado observado en hombres con presencia de deleciones en el brazo largo del cromosoma Y²¹, obedeciendo a las diferentes factores de azoospermia, o regiones AZF a,b y c y la región proximal AZFc/AZFd y, no solo en casos del AZFc como en el presente caso. Las microdeleciones en pacientes con azoospermia se presenta en una proporción de 5% al 10% de los casos, proporción mayor que en oligozoospermia (2% – 5%).²⁹ Moro E. identificó una microdeleción en un paciente con oligozoospermia severa y hipoespermatogénesis, resultados que fueron confrontados con los obtenidos en un hermano fértil, en quien sí se observó el grupo de genes, lo que permitió diagnosticar la presencia de la microdeleción de gen DAZ de **nov**⁵⁷, microdeleción que puede presentarse en hombres con espermatogénesis normal⁵⁸. Otros estudios han demostrado la microdeleción de genes del AZFb, heredada de padres a hijos¹⁸.

Se encontró varicocele de testículo izquierdo, concomitante con la microdeleción de AZF, genes de la familia DAZ y DYS240. Otros estudios han demostrado que la microdeleción puede presentarse en pacientes con patologías concomitantes, como criptorquidia y varicocele, sin que se haya determinado asociación entre estas diferentes alteraciones. Se sugiere por tanto que los casos de azoospermia que presenten patologías adyacentes, pueden ser considerados candidatos para estudios de microdeleciones⁵¹, y que la presencia de varicocele, probablemente esté asociado a la microdeleción

En pacientes con microdeleciones AZFc del cromosoma Y, se ha recuperado espermatozoides por diferentes métodos, 75% por TESE y 45% por biopsia, mientras que las microdelecionados en AZFa, AZFb y

AZFb + C, no se recuperó ninguna actividad espermática.³⁹ Sin embargo, el caso aquí estudiado mostró en la biopsia testicular túbulos seminíferos con ausencia de células germinales en un 80% y células germinales sin maduración en un 20%.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones enunciadas, nos permite identificar factores que pueden ser tenidos en cuenta para el manejo diagnóstico de la infertilidad masculina, en la población Caribe Colombiana:

- Se confirmó una prevalencia de 3.03% en una muestra poblacional de 33 hombres con diagnóstico previo de infertilidad, el 54,5% azoospermico y el 45,5 oligozoospermico. Las microdeleciones se presentan con una frecuencia variada entre poblaciones, a pesar de encontrarse en los intervalos estadísticos mostrados en otros estudios; la variabilidad puede estar relacionada con diversos factores, como diferenciación en grupos poblacionales, características genéticas, factores ambientales, laborales y biológicos; o por factores propios del desarrollo del estudio, como criterios de inclusión, tamaño de la muestra etc.
- Los genes microdeleccionados fueron los estudiados y pertenecientes a la “Familia DAZ”, que se encuentran ubicados en la región AZFc, se encontró que todos los STSs de esta región incluidos en el estudio, estuvieron ausentes, confirmando que los genes de la familia “DAZ”, son los más comprometidos en la población estudiada.
- La prueba escogida para determinar la microdelección del cromosoma Y (Kit de PCR multiplex), mostró efectividad y reproducibilidad en los hallazgos, confirmado mediante la presencia de los controles internos en cada uno de los juegos de iniciadores.

- Fenotípicamente, la azoospermia no obstructiva está relacionada con la delección de genes de la familia DAZ, sin embargo su presencia también ha sido determinada en pacientes sin microdeleciones del cromosoma Y, corroborando que está presente por causas diversas.
- Es necesario continuar identificando los casos de microdeleciones del cromosoma Y, en hombres con diagnóstico previo de infertilidad, mediante espermograma, con ellos se evita dilatar los tiempos en el diagnóstico y pronósticos de la alteración, llegando a toma de decisiones concretas para estos casos. Continuar con investigaciones en esta misma línea nos permite aclarar y establecer diagnósticos precisos por microdelección del cromosoma Y.
- Una vez determinados los casos de microdelección del cromosoma Y, es necesario hacer el seguimiento, mediante la búsqueda, en las líneas paternas y horizontales de los casos reportados, para determinar origen de **Novo** o heredado, del caso, y de acuerdo a los resultados, establecer factores de tipo ambiental, laboral y/o biológico.
- Orientar el consejo genético de la pareja, que le permita analizar las diversas técnicas de reproducción artificial, hacia su futuro reproductivo. La fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones, así como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, son técnicas de reproducción asistida recomendadas en casos de infertilidad masculina por alteraciones severas en la cuenta espermática,⁵⁸ opciones que pueden ser analizadas para el caso en mención.

Identificados por el estado del arte y por los hallazgos del presente estudio, el grado de compromiso de genes de la familia DAZ, en la infertilidad masculina, lleva a proponer el diseño de métodos sencillos y bajo costo, tipo tamizaje, que pueda brindarnos información de los casos posibles, para luego ser analizados a través de técnicas más costosas, de tal forma que el acceso sea previamente establecido y de esa forma aumentar la cobertura de su determinación, llegando a todo tipo de población. Lo que contribuiría a la determinación de la causa básica de infertilidad testicular, proyectando un mejor panorama en su diagnóstico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. BRUGO S, Chillick C, Kopleman S. Definición y causas de la Infertilidad. Centro de estudios de ginecología y Reproducción, Viamonte, Argentina, 2003 pp: 73- 85
2. OMS, Estrategias de Salud sexual y Reproductiva, 2004 pp: 15
3. POIROT, C. Cherruau, B. Infertilidad masculina, Aspectos Clínicos e investigaciones Biológicas; acta Bioquímica clínica latinoamericana, 2005 vol 39 N° 2 pp: 225 – 241
4. LLEDÓ B, Galán F. M, Ten Bernabeu R. Microdeleciones en el cromosoma Y e implicaciones en la esterilidad masculina. Revista Nova vol. 2 N° 002, Bogotá, 2004 pp: 16 - 27
5. LUCENA E, Esteban C, Y Kent M: Determinación de deleciones en el cromosoma Y en hombres infértiles Candidatos a técnicas de reproducción asistida, Universidad Colegio mayor de Cundinamarca, Revista Nova, Bogotá, Colombia, 2004 pp: 16-27
6. POIROT, C. y Cherruau, B. Infertilidad masculina: Aspectos Clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím. Clín. Latinoam., mar./jun. 2005, vol.39, no.2, pp: .225-241.
7. PESCHKA, B. Leygraff J, Van der veen K, Montac M, hartmann B,

Schubert R, and Schwanitz G. Típe y frequency of chromosoma aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm sujecion. revista reproduction human, vol 14, 1999 pp: 2227

8. MARTÍNEZ. Moya. Factor masculino y calidad embrionaria, "Ponencia" Centro Gutemberg, Revista iberoamericana e fertilidad, 2004, pp: 17 - 65 disponible en www.editorialmedica.com/archivos/.../Congre%20SEF02.Ponencias2.pdf. consultado el 12 de septiembre de 2009
9. Gametogénesis; pp: 1 - 30 Disponible en <http://www.monografias.com/trabajospdf/gametogenesis.com> consultado el 25 de mayo de 2009
10. FERNÁNDEZ. Carlos. Embriología. pp: 24 - 30 Disponible en <http://vosmolades.blogspot.com>, consultado el 24 de mayo de 2009
11. CORDOVA. C. anatomía y Fisiología del aparato reproductor Masculino y femenino, editorial Mason. 2003 pp 332-333
12. TEPPA-GARRAN, Alejandro D. y palacios- torres, Anselmo. Evaluación actual de la infertilidad masculina. Invest. clín, d, vol.45, no.4, 2004 pp: 355-370.
13. OLIVA, Rafael. Genes del cromosoma Y y significado clínico, Hospital clínico de Barcelona, Saba del University, 2003 pp 1-6
14. MARGARET L, Delbridge y Jennifer A, Marsahl Graves. Mammalian Y chromosome evolutions and thy male-specific- functions Y-chromosome-borne genes. Journal de reproducción y fertilidad,

Dpto. de Bioquímica y genética Universidad de Bundora,
Australia, 1999. pp: 101

15.MARINA S: ponencia. Actitud ante el paciente azoospermico,
Revista Iberoamericana de fertilidad, 20º congreso de fertilidad,
2002 pp 71 – 72

16.VOGT PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hischmann P,
Kiesewetter F y otros. Human y chromosome
azoospermia factors (azf) mapped to different region Yq11,
section de genetic e infertility molecular; University de
Heidelberg, Alemania, 2003 pp: 740 – 744

17.EDWARDS R.G, Colin E,

18.Bishop. On the origin and frequency Y
chromosome deletions responsible for severe male infertility.
Molecular Human reproductions, Vol 3, 1997 pp: 549 – 554

19.ROLF C, Gromool J, Simoni M, y Nieschlag E. Natural Transmission
of a partial AZFb deletions of the chromosome Over Three
generations, Humana, reproduction, vol 17, 2002, pp: 2267 –
2271

20.KAMISCHKE A, Gromoll J, Simoni M y otros. Transmission of
Chromosomal deletions involving the deleted in azoospermia
(DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son
through intracytoplasmic sperm injection. Human reproduction.
vol 14, 1999. pp: 2320 – 2322

21.FERNÁNDEZ Salgado, Erika, Álvarez Nava, Francisco, Borja

Fajardo, Lizbeth *et al.* Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática. *Invest. clinic*, vol.47, no.4, 2006 pp: 395-403.

21 VOGT, P, H. Human chromosome deletion in Yq11 , AZF candidates and male infertility history and update, actualization, *Molecular human reproductions*, Germany, 1998, vol 4, pp: 739 – 744

22 SIMONI M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletion in Europe: State- of- the art and quality control. Institute of reproductive medicine of the University Munster, Germany, 2000 y pp 402 – 409

23 TAPIA. S. R y Rojas J. Semiología del análisis del semen. *Boletín del Colegio mayor de Urología*, vol. 18. N° 2. México, 2003. pp: 48 – 53

24 FERNÁNDEZ, M.A., CASTILLA, J. A., EXPÓSITO, A. *et al.* Esterilidad masculina y microdeleciones en el cromosoma Y. *Rev Diagn Biol*. [online]. 2001, vol. 50, no. 3 [citado 2009-04 -02], pp: 151-153. Disponible<http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034

25 REIJO R, Lee Ty P, Alagppan R Brown L .G, Rosenberg M, Rozen S, jaffe , T, straus D, Hovata, O, *et al*, Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA- binding protein gene. *Nat gennet*, 1995. Pp: 338,339

26 HELEN Skaletsky, tomoko kuroda- kawaguchi. The

male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Howard Hughes Medical Institute, Whitehead Institute, and Department of Biology, nature vol 423 19 june, 2003 pp: 826-837

27 TESSARI A, E. Salata, A. Ferlin, L. Bartoloni, M.L. Slongo and C Foresta. Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis, molecular human reproduction, vol 10, 2004 pp: 253 – 258

28 BLAGOSKLONOVA O, Fellman F, Clavequin C, Roux C, y Brenson J.L. AZFa deletions in sertoli cell-only syndrome: a retrospective study, molecular human reproduction, vol 6, 2000 pp: 795 – 799

29 FERLIN A, Moro E, Garrolla A y Foresta C. Humana male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM, DFFRY, Humana reproducción, vol 14, 1999 pp: 1710 – 1716

30 KAMP C, Hullen K, Fernandez Sousa M, Schlegel P, Mielnick A, et al: high deletions frequency of the complete AZFa sequence In men with sertoli - cell- only syndrome, molecular Humana reproduction, vol 7 N° 10, 2001 pp: 987 – 994

31 CASTRO G Andrea, López C Patricia, Johnson P M Cecilia, Sovino S Hugo, Martínez Ch Claudia, Vantman B David. Microdelección del cromosoma Y en paciente infértil oligozoospermico severo. Rev. méd. Chile [periódico en la Internet]. 2000 Jul [citado 2009 Abr 02 128(7): pp: 778-782. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000000700011&lng=es.

- 32 FERRAS C. Fernández S. Márquez C, Carvahlo F, Alves C, Silva J , et al. Análisis copia-específico de la microdelección de genes de AZF y de DAZ en síndrome de la detención de Maduración y de célula-solamente de Sertoli,) Departamento de la genética, facultad de la medicina, universidad de Porto, Portugal, Revista reproducción humana vol. 10, Nº 9, 2004 Pp: 755-761.
- 33 S.L.LIOW, F. J. Ghadessy, S.C. Ng and E.L .Yong. Y chromosome microdeletions, in azoospermic or nearazoospermic subjects, are located in the AZFc (DAZ) subregión, molecular human reproduction, vol 4 1998, pp: 763 – 768
- 34 J.P.MULHALL, R.Reijo, R.Alagappan, L. Brown, Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod, March 1, 1997; 12(3): 503-8 (Disponible, en <http://content.nejm.org/cgi/medline/pmid;9130751?hits=20&fyear=1997&where=fulltext&tmonth=Dec&searchterm=azoospermic&fmonth=Feb&year=2007&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resource=HWCI>
- 35 SJOERD Repping, Helen skaletsky et, al. Recombination between Palindromes P5 and P1 on the Human Y Chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic Failure, a m. j.Genet, 2002 pp: 907-909

- 36 BAZA LLUIS: Ponencia espermatogenesis e infertilidad.
1er congreso de ALSIVIR, Rev Iberoamericana de fertilidad, vol.
18, 2001 pp: 11-17
- 37 CARLO FORESTA, Enrico moro, and Alberto Ferlin. Y
Chromosome Microdeletions and Alterations of
Spermatogenesis. University of Padova, Department of Medical
and Surgical Sciences, Clinica Médica 3, 35128 Padova,
Endocrine Reviews, 2001 pp: 226–239
- 38 FORESTA Carlo, Ferlín A , Barbará Arredy, Carla Cazzadore
Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome
Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience, the
journal of clinical endocrinology & metabolism Italy, Italy; marzo
2007, pp: 762 765
- 39 C.V.HOPPS1, A. Mielnik, M. Goldstein, G . D. Palermo,
Z.Rosenwaks and P.N.Schlegel. Detection of sperm in
men
with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and
AZFc regions. Human Reproduction, Vol.18, No.8 , 2003 pp:
1660 - 1665
- 40 CALLEJA-Macías IE, Gutiérrez-G, Guerra L, Villalobos T, Rojas A,
y otros “Determinación de factores Genéticos en
infertilidad masculina idiopática”, Instituto de Medicina
reproductiva del Bajío , Monterrey 2002 pp: 1-51
- 41 LONE F , Vogt, P , Leffers H, Schadwinkel A, Daugaard G

- Skakkebaek A and Rajpert . No AZF deletion in 160 patients
With testicular germ cell neoplasia. Molecular
Human
Reproduction Vol.9, No.9, 2003 pp: 517-521
- 42 FORESTA C, Enrico M, Garolla A, Ferlin A et al. Y
chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic
Infertility. The journal of clinical endocrinology & metabolism
Italy, vol 84. 1999 pp: 3660-3665
- 43 SIMONI, M, Barkker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR,
Vogt PH. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-
chromosomal microdeletions. Int J Androl 1999; pp: 292-299
- 44 .E.AKNIN- Seifer, R. L. Touraine, H. Lejeune, J.L. Laurent,
B.Lauras and R.Levy. A simple, low cost and non-invasive
method for screening Y-chromosome microdeletions in infertile
men, Human Reproduction, vol 18. 2003, pp: 257 – 261
- 45 GRIMALDI P. S Carponi C, Pellegrino R et al, analysis of
Yq micro deletions infertile males by PCR and DNA hybridization
techniques, molecular human reproduction vol 4 N° 12 1998 pp:
1116 – 1121
- 46 Ballescà JL, Matorras R, Viscasillas P, Peinado J A, Romeo.
Registro de Inseminaciones (IAC-IAD). Sociedad Española de
Fertilidad. 1999, rev Iberoamericana de fertilidad, vol 19, 2002
pp: 42-43
- 47 KRAUSZ C. Andrology Unit, Department of
Clinical Physiopathology, Vaile Pieraccini, Firenze, Italy.

Original no consultado, 2005 pp: 105 - 112
disponible en

<http://www.springerlink.com/content/r0327426124461g7>.

citado el 19 de marzo de 2009

- 48 SJOERD R, Helen S, Lange J, Silver S, Van der Veen F, et, al.
Recombination between Palindromes P5 and P1 on the Human
Y Chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic
Failure, a m. j.Genet, 2002. pp: 907-909
49. FERLÍN A, Moro E, Anisto M, Toscano E, betella A, oresta C.
Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic
severe testiculopathies. Human Reproduction, vol 14, 1999, pp:
2286 – 2292
- 49 Meza HE, Rosas H, Vite EJ, De Alba AG Aportación de un caso.
Paciente con varicocele y oligozoospermia, con
microdeleción en cromosoma Y: AZFb+c. Actas urológicas
Españolas, 2007. pp: 286
- 50 GONZÁLEZ. R. Manejo del varón azoospermico. Avances
en reproducción andrology. 2005; pp: 5 - 12 Disponible en
internet [www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia/documentos/
Ponencias 2005](http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia/documentos/Ponencias_2005) consultado el 13 de julio de 2009
- 51 FERNÁNDEZ T, Fernández S, Gonçalves R, Sá R, Costa P ,
Ferrás C, Sousa S, Brehm A, . DAZ gene copies: evidence of Y
chromosome evolution, molecular human reproduction, vol 12 nº
8, 2006 pp: 519 – 523.
- 52 SAXENA R. Laura G, Trevor H, Raaji K. Skaletsky H et

al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned, *Nature Genetics* volume 14, 1996 pp: 292 – 299

53 P. H. Vogt, A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiewewetter, F. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, Vol. 5, No. 7, 1996 pp: 933 – 943

54 RENEE A. Reijo, Dorfman, M. Slee R, Renshaw A, Loughlin K, Cooke H, and David C. Page. DAZ Family Proteins Exist Throughout Male Germ Cell Development and Transit. from Nucleus to Cytoplasm at Meiosis in Humans and Mice¹. *Biology of reproduction* 63, 2000 pp: 1490 – 1496

55 MORO, E. Alberto F, Pauline H, Paolo G, Franchi G, Foresta C. Male Infertility Caused by a *de Novo* Partial Deletion of the DAZ Cluster on the Y Chromosome, the *Journal clinical endocrinology and metabolism*, vol 85 N° 11, 2000 pp: 4069-4073

56 YANET R, Málaga C, Damaris A, Ortiz I, Hernández M, José T, Ruíz A, Detención de la spermatogenesis. *Ginecol Obstet Mex* 2005; pp: 503

ANEXOS

ANEXO Nº 1

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INGRESAR AL ESTUDIO DE
INVESTIGACIÓN**

“ MICRODELECIÓN DEL CROMOSOMA Y E INFERTILIDAD”

**ESTUDIO LLEVADO A CABO POR ESTUDIANTES DE LA MAESTRÍA DE
CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

Ciudad, y fecha

*Señor
Ciudad*

*En forma libre y voluntaria yo, _____
identificado(a) con la cédula de ciudadanía número
_____ manifiesto que:*

- 1. He recibido consejería preprueba, con el fin de realizarme el examen diagnóstico para detectar microdelección del cromosoma Y.*
- 2. Personal entrenado y calificado en consejería me ha preparado y confrontado con relación a mis conocimientos, mis prácticas y conductas relacionadas con el examen.*
- 3. Para la entrega del resultado indistintamente del mismo recibiré otra asesoría denominada posprueba.*
- 4. He recibido información en la cual me aclaran:*

B) Para garantizar el derecho a mi intimidad, la información y datos que he dado en la consulta, el diagnóstico, y de toda la información que pertenezca a mi vida íntima y/o a mi orientación sexual, así como también el resultado de la prueba están sometida a reserva, ya que el resultado de la prueba es de carácter confidencial y se utilizará sólo con fines sanitarios, guardando mi identidad.

Firmado en la ciudad de _____ a los _____
días del mes de _____ del año _____.

ANEXO Nº 2

Table 1. PCR Amplification Product Profile for Test Samples.

Record the presence (+) or absence (-) of the PCR amplification products for each experimental sample.

Multiplex A Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Size of Product (bp)	Map Position						
SY254	DAZ	380	18						
SY157	DYS240	290	20						
SY81	DYS271	209	2						
SY130	DYS221	173	11						
SY182	KAL-Y	125	5						
	SMCX	83	Control						

Multiplex B Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Size of Product (bp)	Map Position						
SYPR3	SMCY	362	7						
SY127	DYS218	274	9						
SY242	DAZ	233	16						
SY208	DAZ	140	17						
	SMCX	83	Control						

Multiplex C Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Size of Product (bp)	Map Position						
SY128	DYS219	228	10						
SY121	DYS212	190	6						
SY145	DYF5151	143	14						
SY255	DAZ	124	19						
	SMCX	83	Control						

Multiplex D Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Size of Product (bp)	Map Position						
SY133	DYS223	177	12						
SY152	DYS236	125	15						
SY124	DYS215	109	8						
	SMCX	83	Control						

Multiplex E Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Size of Product (bp)	Map Position						
	ZFX/ZFY	496	Control						
SY14	SRY	400	1						
SY134	DYS224	303	13						
SY86	DYS148	232	3						
SY84	DYS273	177	4						